

YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU DOKÜMANTASYON MERKEZİ
TEZ VERİ FORMU

Tez No:

Konu:

Üniv. Kodu:

Not: Bu bölüm merkeziniz tarafından doldurulacaktır.

Tezin yazarının

Soyadı: TAŞKIRAN

Adı: Şule

Tezin Türkçe adı: 4'-Didodesil-3-hidroksiflavon Temelli Floresan
Probların Sentez ve Tasarımları

Tezin Yabancı adı: The Synthesis and Characteriation of
4'-Didodecylamino-3-hydroxyflavone as a Florescence Prob

Tezin Yapıldığı

Üniversite: İstanbul Teknik
Üniversitesi

Enstitüsü: Fen Bilimleri

Yılı: 2005

Diğer Kuruluşlar:

Tezin Türü: Yüksek Lisans

Dili: Türkçe
Sayfa Sayısı : 82

Tez Danışmanlarının

Ünvanı: Prof.Dr

Adı: Turan

Soyadı: ÖZTÜRK

Ünvanı:

Adı:

Soyadı:

Türkçe anahtar kelimeler:

İngilizce anahtar kelimeler:

1- Sensör

2- 3-hidroksiflavon

3- Floresans

1- Sensors

2- 3-hydroxyflavone

3- Florescence

Tarih: 30.06.2005

İmza:

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında her türlü desteğini gördüğüm, bana kendisiyle çalışma fırsatını tanıyan, değerli fikirlerinden her zaman istifade ettiğim, tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK'e, TUBITAK G.M.B.A.E' de biyolojik çalışmaları gerçekleştiren Doç.Dr. Kemal Baysal'a, deneysel çalışmalarım sırasında bilgilerinden yararlandığım Dr. Andrey Klymchenko'ya, floresans çalışmalarımı gerçekleştiren Şule Öncül'e, bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma, çalışmalarına olanak sağlayan Fen Bilimleri Enstitüsüne teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım da beraber çalıştığım, arkadaşlarım Bahar Taşan ve Simay Çıkrıkçı'ya ve son olarak hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen sevgili anneme, babama, kardeşlerime sonsuz teşekkürler ederim.

MAYIS 2005

Şule TAŞKIRAN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xii

I. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı	1
II. TEORİK KISIM	3
2.1. Triterpenler	3
2.2. Flavonoidler	6
2.2.1. Flavonoidlerin Sınıflandırılması	7
2.2.1.1. Flavonoidlerin heterohalkadaki $/-C_3/$ yapısına göre sınıflandırılması	7
2.2.1.2. Aromatik Halkaya Bağlanan Sübstütientlere Göre Flavonoidlerin Sınıflandırılması	9
2.3. Flavonlar	13
2.3.1. Hidroksil ve Metoksil İçeren Flavonlar	14
2.3.1.1. Mono-O-substitüe Flavonlar	14
2.3.1.2. Di-O-substitüe Flavonlar	15
2.3.1.3. Tri-O-substitüe Flavonlar	15
2.3.1.4. Tetra-O-substitüe Flavonlar	16
2.3.1.5. Penta-O-substitüe flavonlar	16
2.3.1.6. Hekza-O-substitüe Flavonlar	17
2.3.1.7. Hepta-O-substitüe Flavonlar	18
2.3.2. C-Metilflavonlar	18
2.3.3. Metilendioksiflavonlar	19
2.4. Flavonoller	19
2.4.1. Mono-O-substitüe Flavonoller	19
2.4.2. Di-O-substitüe Flavonoller	20

2.4.3. Tri-O-substitue Flavonoller	20
2.4.4. Tetra-O-substitue Flavonoller	21
2.5. Kalkonlar	21
2.5.1. Basit Kalkonlar	22
2.5.2. Kino Kalkonlar	22
2.6. Flavonoidlerin Tanınmaları	23
2.6.1. Renk Reaksiyonları	23
2.6.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu	23
2.6.3. NMR Spektrumu ile Flavonoidlerin Yapı Analizi	24
2.7. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri	25
2.8. Moleküler Floresans Spektroskopisi	26
2.8.1. Floresans Spektroskopisinin Teorisi	27
2.8.2. Floresans Oluşumunun Prensipleri	27
2.8.3. Floresansı etkileyen faktörler	30
2.8.3.1. Yapısal faktörler	30
2.8.3.2. Sıcaklık ve viskozite	31
2.8.3.3. Çözücü	31
2.8.3.4. pH	32
2.8.4. Floresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişki	32
2.8.5. Eksitasyon ve Emisyon Spektrumları	34
2.8.6. Organik maddelerin spektrofotometre cihazı ile analizi	34
2.9. Uyarılmış Seviye Molekül içi Enerji Aktarımı (ESIPT)	35
2.9.1. 3-Hidroksiflavonların ESIPT Reaksiyonları	38
2.10. Floresans Problemleri	39
2.10.1. 3 hidroksi flavonların Floresans Prob Olarak Kullanımı	41
2.10.2. Prob- Çözücü Etkileşimleri	42
2.11. 3-Hidroksi Flavonların Sentez Yöntemleri	43
2.11.1. Algar-Flyn-Oyaamada reaksiyonu ile 3-hidroksiflavon sentezi	43
3. DENEYSEL KISIM	47
3.1. Genel Teknikler	47
3.1.1. Kromatografi	47
3.1.1.1. Sütün Kromatografisi	47
3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi	47

3.1.2. Spektrometreler	47
3.1.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrofotometresi	48
3.1.2.2. İnfrared (IR) Spektrofotometresi	48
3.1.2.3. ¹ H NMR Spektrumları	48
3.1.2.4. Floresans Spektrofotometresi	48
3.1.3. Çözücüler ve Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.1.4. Kullanılan Elektronik Aygıtlar	49
3.2. Sentez Bileşikleri	49
3.2.1. FN12 Sentezi İçin Genel Prosedür	49
3.2.1.1. N,N-didodesilbenzamin Sentezi İçin Genel Prosedür	49
3.2.1.2. 4-(didodesilamino)benzaldehit Sentezi İçin Genel Prosedür (Vilsmeier Formulation)	450
3.2.1.3. Kalkon Sentezi İçin Genel Prosedür (Algar-Flyn-Oyaamada Reaksiyonları	50
3.2.1.4. 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi için Genel Prosedür (Halka Kapanması)	51
3.2.2. OFN Sentezi İçin Genel Prosedür	51
3.2.2.1. 2-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Sentezi İçin Genel Prosedür	52
3.2.2.2. Kalkon Sentezi İçin Genel Prosedür	52
3.2.2.3. 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-7-(oktiloksi)-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi İçin Genel Prosedür	53
3.2.3. MFN12 Sentezi İçin Genel Prosedür	53
3.2.3.1.1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)etanon Üzerinden kalkon sentezi için genel Prosedür	53
3.2.3.2. 2-(4-(didodecylamino)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-4H- chromen-4- one (Flavon) Sentezi için genel Prosedür	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. Sentez Bileşikleri ve NMR spektrumları	55
4.1.1. FN12 serisi	57
4.1.1.1. N,N-didodesilbenzamin Sentezi	57
4.1.1.2.-(didodesilamino)benzaldehit Sentezi	58
4.1.1.3. Kalkon Sentezi	59
4.1.1.4. 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi	59

4.1.2. OFN12 serisi	60
4.1.2.1-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Sentezi	60
4.1.2.2. Kalkon Sentezi	61
4.1.2.3 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-7-(oktiloksi)-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi	62
4.1.3. MFN12 serisi	63
4.1.3.1. 1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)etanon Üzerinden kalkon sentezi	63
4.1.3.2. 2-(4-(didodesil)fenil)-3-hidroksi-7-metoksi-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi	63
4.2. Sentezlenen Problara ait Floresans Ölçümleri	67
4.2.1. FN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri	69
4.2.2. OFN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri	71
4.2.3. MFN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri	73
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	81

KISALTMALAR

İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
IR	: Infrared
FOT Probu	: Flavon Oleanolik Asit kombinasyonu sonucu oluşan prob
F Probu	: 4'-dimetilamino-3-hidroksiflavon
FE Probu	: 4'-dietilamino-3-hidroksiflavon
BMFE	: 6-bromometil-4'-N,N-dietilamino-3-hidroksiflavon
3HK	: 3-hidroksikromon
3HF	: 3-hidroksiflavon
ESIPT	: Excited State Intramolecular Proton Transfer (Uyarılmış Hal Molekülüçü Proton Transferi)
N	: Probun normal formunun temel hali
T	: Probun tautomer formunun temel hali
N*	: Probun normal formunun uyarılmış hali
T*	: Probun tautomer formunun uyarılmış hali

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Flavonoidlerin hetero halkadaki $-C_3-/I$ yapısına göresınıflandırılması.....	8
Tablo 2.2. Flavonoid Bileşiklerinin Renk Reaksiyonları.....	23
Tablo 4.1 Gerçekleştirilen Reaksiyonlar.....	65
Tablo 4.2 MFN12 probuna ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	76
Tablo 4.3 FN12 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	76
Tablo 4.4 OFN12 probuna ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1	: FN12 Probu	2
Şekil 1.2	: MFN12 Probu	2
Şekil 1.3	: OFN12 Probu.....	2
Şekil 2.1	: Taşıdıkları halka sayısına göre triterpenlerin sınıflandırılması	3
Şekil 2.2	: Aoron Yapısı.....	4
Şekil 2.3	: Flavon Yapısı.....	4
Şekil 2.4	: Flovan Yapısı.....	4
Şekil 2.5	: Difenilpropan iskeleti içeren flavonoidler.....	5
Şekil 2.6	: 1,1-Difenilpropan ve neoflavonoid yapıları.....	6
Şekil 2.7	: Flavonoidlerin Aromatik halka sübstütientine göre sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.8	: Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşmepozisyonları.	11
Şekil 2.9	: Hinokiflavon Yapısı.....	12
Şekil 2.10	: Brioflavon Yapısı.....	13
Şekil 2.11	: Mono-O-substitue Flavonlar.....	14
Şekil 2.12	: Di-O-substitue Flavonlar.....	15
Şekil 2.13	: Tri-O-substitue Flavonlar.....	15
Şekil 2.14	: Tetra-O-substitue Flavonlar.....	16
Şekil 2.15	: Penta-O-substitue Flavonlar.....	17
Şekil 2.16	: Hekza-O-substitue Flavonlar.....	18
Şekil 2.17	: Hepta-O-substitue Flavonlar.....	18
Şekil 2.18	: C-Metilflavonlar.....	18
Şekil 2.19	: Metilendioksiflavonlar.....	19
Şekil 2.20	: Mono-O-substitue Flavonoller.....	20
Şekil 2.21	: Di-O-substitue Flavonol.....	20
Şekil 2.22	: Tri-O-substitue Flavonol.....	21
Şekil 2.23	: Tetra-O-substitue Flavonol.....	21
Şekil 2.24	: Kalkonun Flavona Dönüşümü.....	22
Şekil 2.25	: Kinokalkon.....	22
Şekil 2.26	: Flavonoid Yapısı.....	24
Şekil 2.27	: J ablonski Diyagramı.....	27
Şekil 2.28	: Floresan Gösteren Bileşikler.....	30
Şekil 2.29	: Intermoleküler ESIPT Reaksiyonu.....	36
Şekil 2.30	: Intramoleküler ESIPT Reaksiyonu.....	37
Şekil 2.31	: 3-Hidroksiflavonların ESIPT Reaksiyonları.....	39
Şekil 2.32	: Doğal Floresans Maddelere Örnekler.....	40
Şekil 2.33	: Yapay Floresan Maddelere Örnekler.....	41

Şekil 2.34	: Anilin Üzerinden Dialkilamino Benzaldehit Bileşiğinin Sentezlenmesi.....	43
Şekil 2.35	: (Vilsmeier Formylation) dialkilaminobenzene aldehit substitüentinin eklenmesi.....	44
Şekil 2.36	: 5-klorometil-2-hidroksi asetofenon bileşiği.....	45
Şekil 2.37	: Kalkondan 3-Hidroksi Flavon Eldesi.....	46
Şekil 4.1	: Sentezlenen Problar.....	55
Şekil 4.2	: FN12 Probu.....	56
Şekil 4.3	: MFN12 Probu.....	56
Şekil 4.4	: OFN12 Probu.....	56
Şekil 4.5	: N,N-Didodesilbenzamin ¹ H-NMR spektrumu.....	57
Şekil 4.6	: 4-(Didodesilamino)benzaldehit ¹ H-NMR spektrumu.....	58
Şekil 4.7	: FN12 ait ¹ H-NMR spektrumu.....	60
Şekil 4.8	: 2-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon ¹ H-NMR spektrumu.....	61
Şekil 4.9	: OFN12 ait ¹ H-NMR spektrumu.....	62
Şekil 4.10	: MFN12'ye ait ¹ H-NMR spektrumu.....	63
Şekil 4.2.1.1	: Farklı çözücülerde FN12 Probu için elde edilen maksimum absorbans	68
Şekil 4.2.1.2	: Farklı çözücülerde FN12 Probu için elde edilen maksimum emisyon noktaları.....	69
Şekil 4.2.1.3	: FN12 probunun farklı polaritelere sahip çözücüler içinde T* bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumları.....	70
Şekil 4.2.2.1	:Çözücünün elektronik polarizlenebilirliğinin birim fonksiyonu olan f(n) ile prob FN12 nin absorbsiyon maksimumundaki pozisyonu	71
Şekil 4.2.2.2	: OFN12 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı f(ε) grafiği.....	72
Şekil 4.2.2.3	: OFN12 Probunun farklı polaritelere sahip 8 çözücü içindeki karşılaştırmalı floresans spektrumları	73
Şekil 4.2.3.1	:Çözücünün elektronik polarizlenebilirliğinin birim fonksiyonu olan f(n) ile prob MFN12 nin absorbsiyon maksimumunun karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.2.3.2	: MFN12 probuna ait artan polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumları.....	74
Şekil 4.2.3.3	: MFN12 Probunun farklı polaritelere sahip 8 çözücü içindeki karşılaştırmalı floresans spektrumları.....	75

4'-DİDODESİLAMİNO-3-HİDROKSİFLAVON TEMELLİ FLORESAN PROBLARIN SENTEZ VE TASARIMLARI

ÖZET

3-Hidroksiflavonlar, iki belirgin floresan pik verirler ve bu özelliklerinden dolayı, özellikle biyolojik teşhis alanında önemli sensör adaydırlar. Sadece 3-hidroksiflavonlara ait olan, iki floresan pik verebilme özelliği, bu moleküllerin uyanılma durumunda (excited state), iç proton transferi (intramoleküler proton transfer) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Ortaya çıkan iki, yüksek yoğunluktaki pik, iyi ayrılmış ve molekülün çevresel faktörlerinden etkilenebilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı literatürde solvent polaritesi, iyon sensör ve miseller ve fosfolipid veziküller gibi biyolojik sistemlerde sensör olarak kullanılması uygulamaları bulunmaktadır. Özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla bazı analogları yakın zamanda sentezlenmiştir.

Bunun yanında, özellikle biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girecek floresans sensörler geliştirmek için, yeni 3-hidroksiflavon analoglarının sentez edilmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, 3-hidroksiflavon'un yağsı özelliğini artıran, "didodesil" gibi uzun zincirin, çeşitli 3-hidroksiflavon türevlerine takılması amaçlanmıştır. Non-polar özelliği artacak olan sensörün, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi bu çalışma ile planlanmıştır.

THE SYNTHESIS AND THE STUDY OF FLUORESCENT PROBES BASED ON 4'-DIDODECYLAMINO-3-HYDROXYFLAVONES

SUMMARY

Fluorescence microscopy of the living cell is a rapidly developing field of research with countless potentialities, and the success in visualization of cellular sub-structures, membranes, and macromolecules provided a strong impulse for further development of Fluoresan sensors.[10]

3-hydroxyflavones exhibit the excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) reaction which results in two emission bands belonging to normal excited state (N^*) and to the photo-tautomer (T^*) reaction product.[8,9]

The latter is shifted dramatically to longer wavelengths so that the two forms can be easily seen in emission as resolved separate bands. The positions of the two bands and, what is most essential, the ratios of their intensities are very sensitive to different perturbations.

3-hydroxyflavone (3-HF) derivatives are very attractive fluorescence sensors due to their ability to respond to small changes in their microenvironment via a dramatic alteration of the relative intensities of their two well-separated emission bands. We developed fluorescence probes with locations at different depths and orientations of 3-HF moiety in the phospholipid bilayer, which determine their fluorescence behavior. While the spectral shifts of the probes correlate with their binding site polarity, the intensity ratio is a complex parameter that is also sensitive to the local hydration. We demonstrate that even the deeply located probes sense this hydration effect, which can be modulated by the charge of the lipid heads and is anisotropic with respect to the bilayer plane. Thus the two-band ratiometric fluorescence probes can provide multiparametric information on the properties of lipid membranes at different depths.

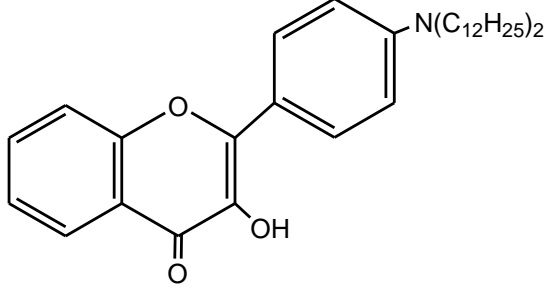
1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

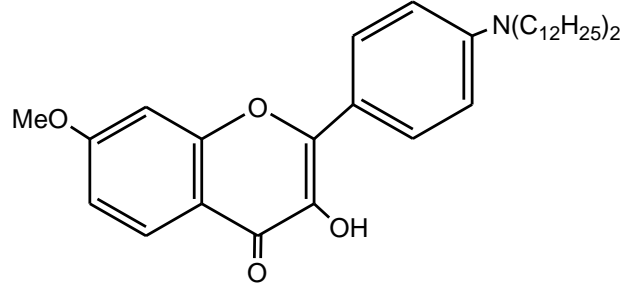
Problar genellikle flouresans özellik gösteren organik yapılardır ve en uygun spektroskopik özellikler ile fonksiyonel performansı bir arada taşıdıkları ölçüde değer kazanırlar.[10] Son yıllarda bazı flavon türevleri hazırlanarak biyolojik membranları incelemek amacıyla araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzde yeni flouresans prob arayışları ile ilgili araştırmalar biyoteknoloji, moleküler ve hücre biyolojisi, eczacılık, kimya, fizik ve bunlarla ilgili disiplinlerde sürdürülmektedir [14]. 3 hidroksi flavon türevleri mikro çevrelerinde meydana gelen ufak değişimlere karşı çok hassas olduklarından ve de bu değişimlere birbirlerinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt verdiklerinden oldukça popüler floresan sensörleridir. Sadece 3-hidroksiflavonlara ait olan, iki floresan pik verebilme özelliği, bu molekülleri uyarılma durumunda (excited state), iç proton transferi (intramolecular proton transfer) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır.[16] Farklı noktalarda ve oryantasyonlarda fosfolipid tabakada yerleştirilmiş 3HF uzantılarının davranışları sayesinde floresan problar geliştirilmiştir. Flavonollere 2-fenil halkasının (β - halkası) para pozisyonuna dialkilamino gurubu gibi kuvvetli elektron verici grupların bağlanması moleküldeki proton transferlerinin sürekliliğini sağladığı ve böylece molekülün uyarılmış halinin dipol momentini artırdığı görülmüştür. Bunun yanında, özellikle biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girecek floresans sensörler geliştirmek için, yeni 3-hidroksiflavon analoglarının sentez edilmesi önem taşımaktadır.

Bu amaçlarla çalışmamızda, tasarlanan problarının dizaynında 3-hidroksiflavonların, floresans spektrumunda konjugasyonu arttırarak kırmızı alana kaymasını sağlamak, ve alkil grubunun farklı uzunluklarda olması ile de probun membranda çözünürlüğünü arttırmak için, elektron verici grup olarak benzaldehidin para pozisyonuna dialkilamino grupları farklı uzunluklarda takılarak 3-hidroksiflavon'un

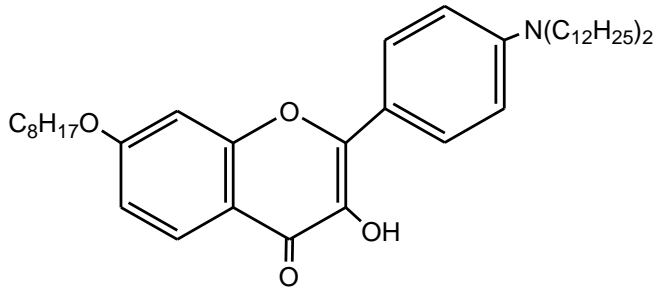
yağsı özelliğinin artırılarak non-polar özelliği artmış olan sensörlerin sentez edilmesi, böylece biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi planlanmıştır. Bu amaçlarla FN12 (şekil 1.1.), MFN12 (şekil 1.2.), ve OFN12 (şekil 1.3.) problemleri sentezlenmiştir.



Şekil 1.1: FN12 Probu



Şekil1.2: MFN12 Probu

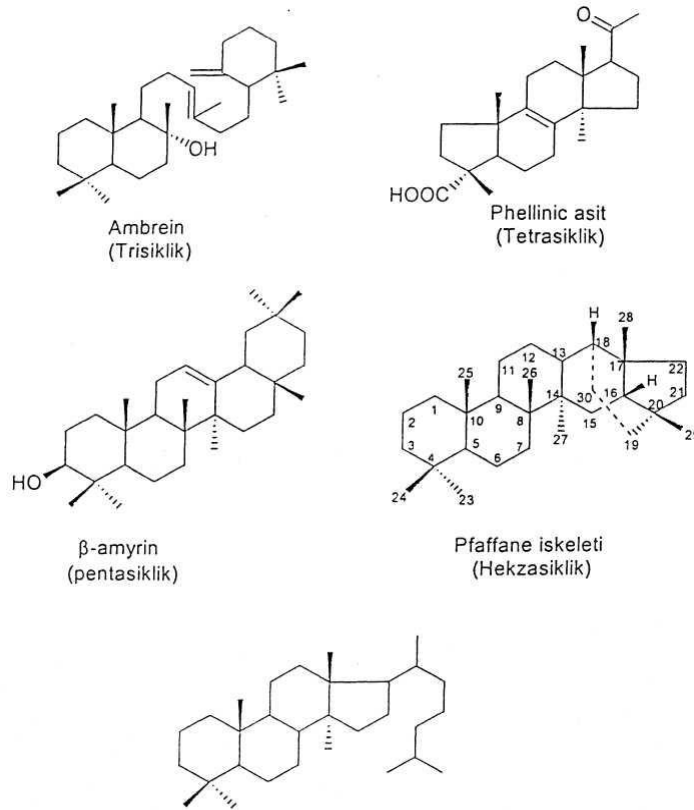


Şekil 1.3: OFN12 Probu

2.TEORİK KISIM

2.1. Triterpenler

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş otuz karbonlu iskelete sahip yapılardır, bitkilerde serbest veya bağlı olarak bulunurlar [1] Triterpenler taşıdıkları halka sayısına göre başlıca bisiklik, trisiklik, tetrasiklik, pentasiklik ve hekzasiklik olmak üzere 5 gruba ayrılabilirler (Şekil 2.1), hiç halka taşımayanlar ise asiklik triterpenleri oluşturur. [1,4]

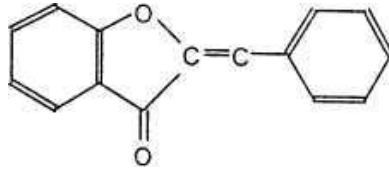


Şekil 2.1: Taşıdıkları halka sayısına göre triterpenlerin sınıflandırılması

2.2. Flavonoidler

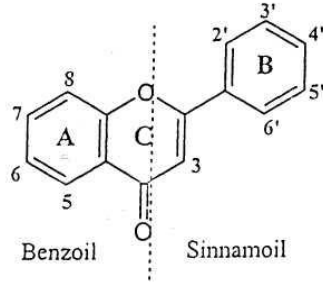
Flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Günümüze kadar bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmektedir. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6 - C_3 - C_6$) yapısı teşkil eder. Difenilpropan iskeleti içeren doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoidler olmak üzere, üç ana grupta toplanırlar. Bu grupların her biri de çeşitli alt sınıflara ayrılırlar.

1,3-difenilpropan yapısındaki propan zinciri, oksijen atomu üzerinden, fenil halkası ile birleşerek, beş veya altı üyeli heterosiklik üçüncü bir halka oluşturabilir. Böylece trisiklik bir sistem meydana gelir. Beş üyeli hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik yapıya auron (Şekil2.2.1), türevlerine ise auronoidler denir.[21]

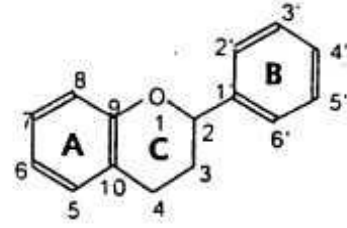


Şekil 2.2: Auron Yapısı

Altı üyeli hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik sistem ise, hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak, iki farklı yapıda bulunabilir. Bunlardan birisi 2-fenilkroman veya fenilbenzopiran iskeletine sahip flavan (Şekil 2.4), diğeri ise 2-fenilbenzo- γ -piron iskeleti içeren flavondur (Şekil 2.3).



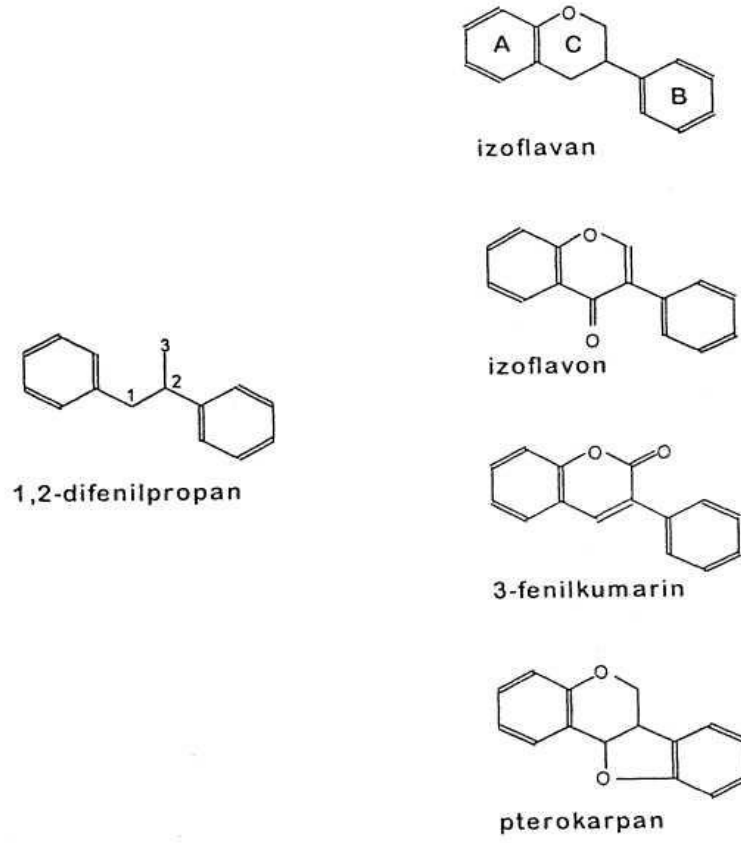
Şekil 2.3.: Flavon Yapısı



Şekil 2.4: Flavan Yapısı

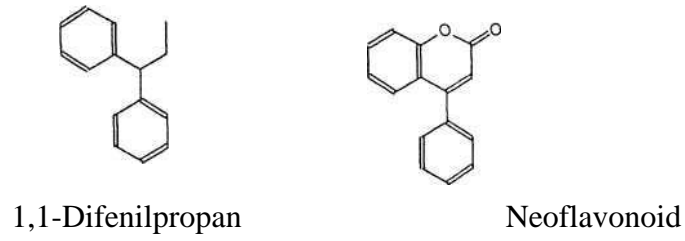
Genellikle flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir. Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar **A** ve **B**, hetero halka ise **C** ile gösterilir. **A** ve **C** halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. **B** halkasındaki atomlar ise. üssü (') rakamlarla numaralandırılır. [24]

Fenil gruplarının propan zincirine 1,2-pozisyonlarında bağlanmasıyla 1,2-difenilpropan iskeleti oluşur (Şekil 2.5). 1,2-difenilpropan iskeletinde, propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C-3) oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile sıklıklaşması sonucu oluşan hetero halkalı trisiklik yapıya izoflavan denir. [28] İzoflavan yapısındaki hetero halkanın modifikasyonuna bağlı olarak izoflavon, 3-fenilkumarin ve pterokarpan meydana gelir. Bu bileşiklerin çekirdek yapıları Şekil 2.3 'de verilmiştir.



Şekil 2.5: -Difenilpropan iskeleti içeren flavonoidler.

Fenil gruplarının difenilpropan iskeletine 1,1 pozisyonlarında bağlanmasından oluşan ve 1,1-difenilpropan iskeleti içeren bileşikler sınıfına ise neoflavonoidler denir (Şekil 2.2.5).



Şekil 2.6: 1,1-Difenilpropan ve neoflavonoid yapıları

2.2.1. Flavonoidlerin Sınıflandırılması

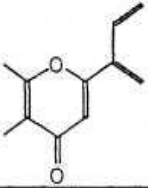
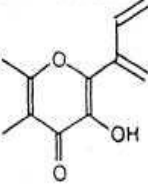
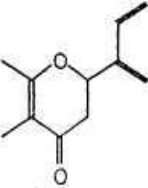
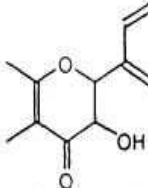
Tüm monomerik flavonoidler iki aromatik halkanın üç karbon atomlu zincir/-C₃ -/ üzerinden birleşmesiyle oluşan C₁₅ iskeleti içerirler. Difenilpropan yapısındaki propan zincirinin, çeşitli yollarla değişikliğe uğramasından farklı flavonoid sınıfları ve alt sınıfları oluşur. [14] Üç karbonlu zincirin oksijen üzerinden aril halkası ile siklikleşmesinden trisiklik sistem oluşur. Altı üyeli heterosiklik halkanın oluşmasıyla flavonoid ve izoflavonoidler, beş üyeli halkanın oluşmasıyla ise auronoidler meydana gelir. İzoflavonoid iskeletinin oksijen üzerinden yeniden siklikleşmesi. tetrasiklik bir sistem, olan pterokarpanoidleri oluşturur. Böyle trisiklik veya tetrasiklik sisteme sahip olmayan, aromatik halkalar arasında asiklik sistem içerenlere ise kalkonoidler denir.[18]

Flavonoid yapısı, ayrıca keto ve hidroksil gruplarıyla yada doymamışlığın ilavesiyle de değiştirilebilir. Flavonoidleri iskelet yapısında keto grubunun varlığına göre. "onoidler" keto grubu içerenler ve "anoidler" keto grubu içermeyenler, olmak üzere iki gruba ayırmak da olasıdır.

2.2.1.1. Flavonoidlerin Hetero Halkadaki / -C₃ - / Yapısına Göre Sınıflandırılması

Flavonoid yapılarında C₃-sisteminin oluşturduğu heterosiklik halka, değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilir. Hetero halkanın yükseltgenme derecesi flavonoidlerin alt sınıflarını belirleyen bir göstergedir. C₃-sisteminin yükseltgenme derecesine bağlı olarak, bilinen flavonoid sınıfları Tablo 2.1'de verilmiştir. [17]

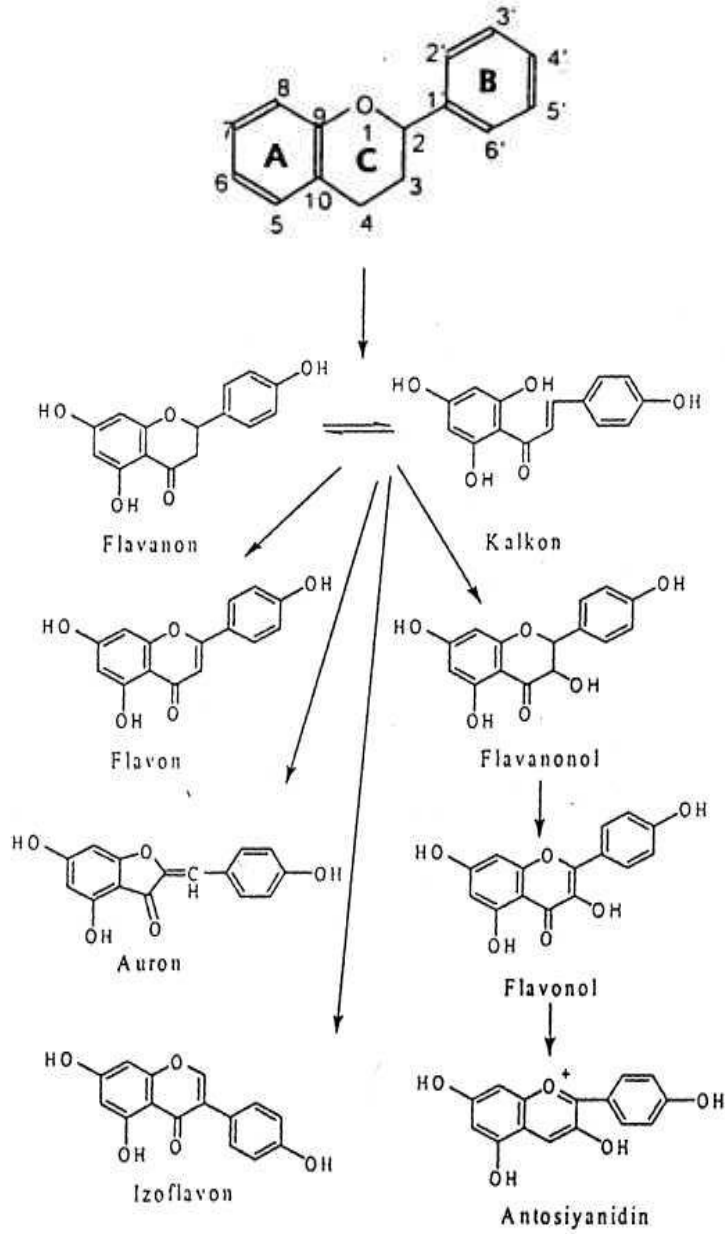
Tablo 2.1: Flavonoidlerin hetero halkadaki / -C₃ - I yapısına göre sınıflandırılması

Flavonoid sınıfları	/-C ₃ -/ yapısı	Örnekler	A ve B halka hidroksillerinin pozisyonları
FLAVONLAR		Apigenin Luteolin	5,7,4' 5,7,3',4'
FLAVONOLLER		Kaempferol Quercetin Myricetin	5,7,4' 5,7,3' 5,7,3',4'
FLAVANONLAR (Dihydroflavonlar)		Naringenin Bütün Eriodiktyol	5,7,4' 5,7,3' 5,7,3',4'
FLAVANONOLLER (Flavanon-3-oller)		Fussin Dihidrokaempferol Taxifolin	7,3',4' 5,7,4' 5,7,3',4'

FLAVAN-3-OLLER (Katekinler)		Katekin Gallokatekin	5,7,3',4' 5,7,3',4',5'
FLAVAN-3,4-DİOLLER (Leucocyanidinler)		Leucocyanidin Leucodelphinidin	5,7,3',4' 5,7,3',4'
ANTOSİYANİDİNLER		Delphinidin Pelargonidin Cyanidin	5,7,3' 5,7,4' 5,7,3',4',5'
KALKONLAR		Isoliquiritigenin Butein	4,2',4'
DİHİDROKALKONLAR		Phloretin Hidroksiphloretin	4,2,4',6' 3,4,2',4',6'
AURONLAR		Sulfuretin Aureusidin	6,3',4' 4,6,3',4'

2.2.1.2. Aromatik Halkaya Bağlanan Sübstütientlere Göre Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavonoidlerin yapı çeşitliliği, yalnız difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenme özelliği ile sınırlı değildir. Aynı zamanda, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan substituentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine neden olan faktörlerdir (Şekil 2.7) .

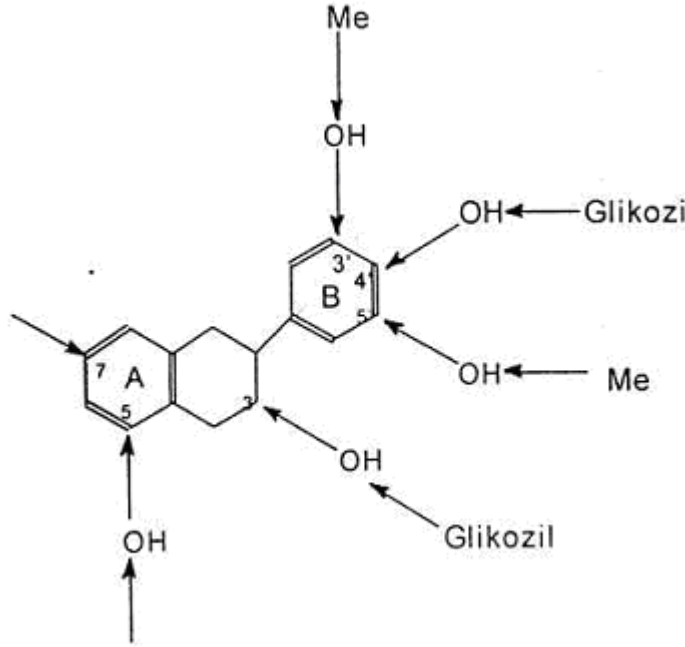


Şekil 2.7 : Flavonoidlerin aromatik halka sübstütientine göre sınıflandırılması

Flavonoid yapılarında yer alan en yaygın sübstütientler hidroksil gruplarıdır. Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubunun bulunduğu bilinmektedir. A halkasının genellikle floroglusin tipi hidroksillenmeye (C-5 ve C-7 pozisyonlarında) yatkın olduğu gözlenmiştir. Ancak, A halkasının başka pozisyonlarda da hidroksillendiği flavonoidler doğada yaygındır. Örneğin, C-6 ve C-8 pozisyonlarının hidroksillendiği flavonoidler de çeşitli bitki türlerinde bulunmuştur. B halkasında ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu zamanda C-3' ve C-5'

pozisyonları hidroksillenmiştir. Son iki pozisyondaki (C-3¹ ve C-5') hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunurlar. Aromatik halkalarda hidroksil grubu içermeyen veya C-2' pozisyonu hidroksillenmiş flavonoidler doğada nadir hallerde bulunurlar.[10,12,15]

Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkillenir veya glikozillenirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozlu türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Metoksi flavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksil grubuna rastlanmaktadır. Ancak, doğada mono-, di- veya trimetoksi flavonoidlere daha sık rastlanır. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil grupları nadir hallerde metillenmiş olurlar.[2,6,9] Flavonoid yapılarında substituentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.8.'de verilmiştir.



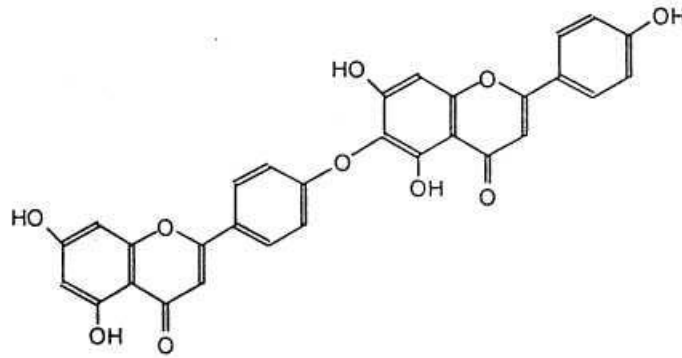
Şekil 2.8: Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları.

Bitkilerde bulunan, başka bir flavonoid grubu da sülfatlanmış flavonoidlerdir. Bu flavonoidler, molekülde bulunan bir veya bir kaç hidroksile ya da şeker kalıntısına sülfat grubunun bağlanmasıyla oluşur.

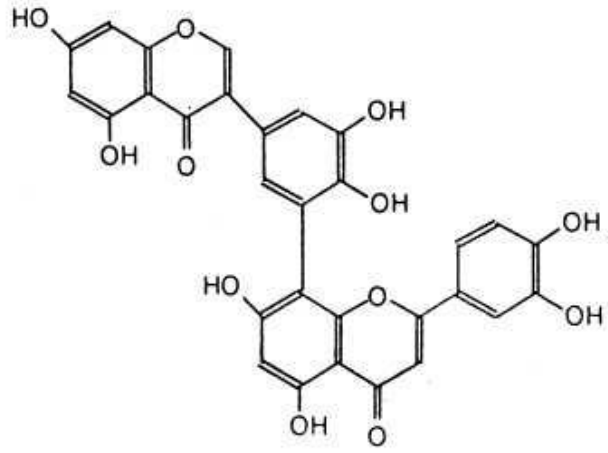
Hiç şüphesiz, doğada yukarıda sözü edilenlerden farklı pozisyonlarda da hidrksillenmiş, metoksillenmiş veya glikozillenmiş flavonoidler de bulunmaktadır. Uygun bölümlerde, çok yaygın olmayan bu flavonoid yapılarından söz edilecektir.

Bitkilerde flavonoidlerin dimer formları da yaygındır. Bu tür bileşikler biflavonoidler olarak adlandırılırlar. Biflavonoidler monomer flavonoid moleküllerinin kondensasyonu sonucu oluşurlar. Çoğu flavonoidler bu tür reaksiyonlara girme yeteneğine sahiptirler. Biflavonoid yapılarında, flavonoid birimleri birbiriyle -O-, -C- veya -C-C- bağı ile bağlanmıştır. Biflavonoidler ilk olarak 1970'li yıllarda teşhis edilmiştir. Biflavonoid molekülünde iki flavon, iki flavanon veya katekin, flavon ve flavanon birbiriyle birleşmiş haldedir. Monomer katekin birimlerinden oluşan biflavonoidlere proantosiyanidinler de denir. Başka flavonoid sınıflarının örneğin, kalkon, auron ve izoflavonların biflavonoidleri de bilinmektedir. Bitkilerde iki molekül apigeninden oluşan biflavonoidler daha yaygındır.[16]

Biflavonoid yapılarında, flavonoid birimleri değişik yollarla bağlanabilirler: flavonoid birimleri yalnız A-A, B-B, ve C-C halkalarının bağlanmasından oluşabildikleri gibi, aynı zamanda farklı halkaların (örneğin A ve B halkası) bağlanmasıyla da oluşabilirler. Monomer birimleri -C-C- ve -O- bağılı biflavonoidlere ait örnekler şekil 2.9 ve şekil 2.10 da verilmiştir. aşağıda verilmiştir:



Şekil 2.9: Hinokiflavon



Şekil 2.10: Brioflavon

2.3. Flavonlar

Flavonlar flavonoidlerin bitki aleminde yaygın olarak rastlanan bir sınıfıdır. Flavonların çekirdek iskeleti şekil 2.3 'de verilmiştir. Bu bileşiklerin hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dihidro türevleridir. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Günümüzde bitkilerden 300'ün üstünde flavon aglikon izole edilmiştir.[27]

Flavonların basit üyeleri, aromatik halkalarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleridir. Yapılarında yalnız oksijen fonksiyonu (hidroksi ve/veya metoksil grupları) içermelerinden dolayı, bu grup bileşiklere, oksijenli veya O-substitue flavonlar da denir. Flavonların O-substitue türevleri doğada yaygındır. Flavonlar yapılarında bulunan. O-substituentlerin (hidroksil ve metoksil gruplarının) sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler.[20,21]

Yapılarında O-substituentler yanında izoprenil, geranil, metilendioksi ve başka grupların da bulunduğu, değişik flavon türevleri doğada yaygındır. Substituentlerin türüne bağlı olarak flavonlar genellikle, hidroksil ve/veya metoksil içeren (O-substitue) basit flavonlar. yada bu gruplar beraberinde başka substituentleri de içeren karmaşık flavonlar olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar.

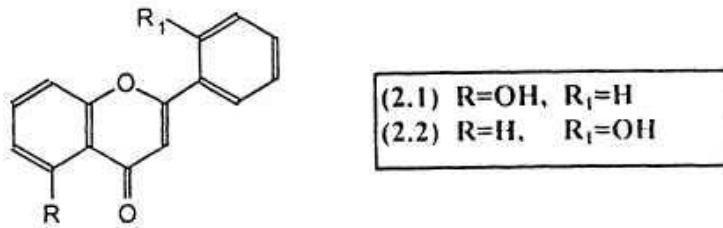
2.3.1. Hidroksil ve Metoksil İçeren Flavonlar

O-substitue flavonlar yapılarında bulunan hidroksil ve /veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılırlar.

Yapılarında bir hidroksil veya metoksil grubu içeren flavon türevlerine mono-O-substitue flavonlar, iki hidroksil veya iki metoksil yada bir hidroksil ve bir metoksil grubu içerenlere ise di-O-substitue flavonlar denir. Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı üç olan flavonoidler tri-O-substitue flavonlardır. [22,30] Çeşitli bitki türlerinden tetra-, penta-, hekza- ve hepta-O-substitue flavonlar da izole edilmiştir. Flavonların yapısında O-substituentler genellikle A halkasının C-5 ve C-7, B halkasının ise C-3' ve C-4¹ pozisyonlarında bulunurlar. Ancak, başka pozisyonlarda da O-substituentlerin bulunması mümkündür ve çeşitli bitkilerden bu tür bileşikler izole edilmiştir.

2.3.1.1. Mono-O-substitüe Flavonlar

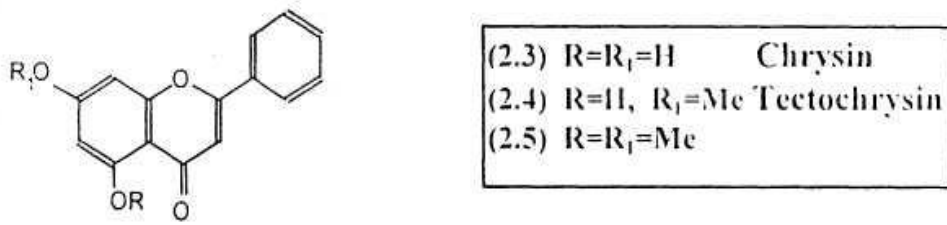
Mono-O-substitue flavonlar doğada yaygın değildir. Bu bileşiklerden 5-hidroksiflavon (primuletin) Şekil 2.11 (2.1) ve 2'-hidroksiflavon (2.2) bitkilerden izole edilmiştir.



Şekil 2.11: Mono-O-substitüe Flavonlar

2.3.2. Di-O-substitue Flavonlar

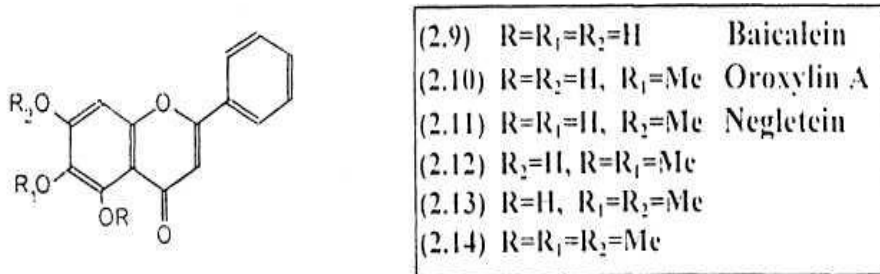
Flavonların farklı pozisyonlarda oksijenlenmiş (hidroksilli ve/veya metoksilli) di-O-substitue türevleri çeşitli bitki türlerinden izole edilmiştir. Teorik olarak 36 farklı dihidroksiflavon yapısı mümkündür. [27] Ancak günümüze kadar onların yalnız bir kaçı doğada bulunabilmiştir. Bitkilerden elde edilen dihidroksiflavonlar Şekil 2.12 'de verilmiştir.



Şekil 2.12: Di-O-substitue Flavonlar

2.3.1.3. Tri-O-substitue Flavonlar

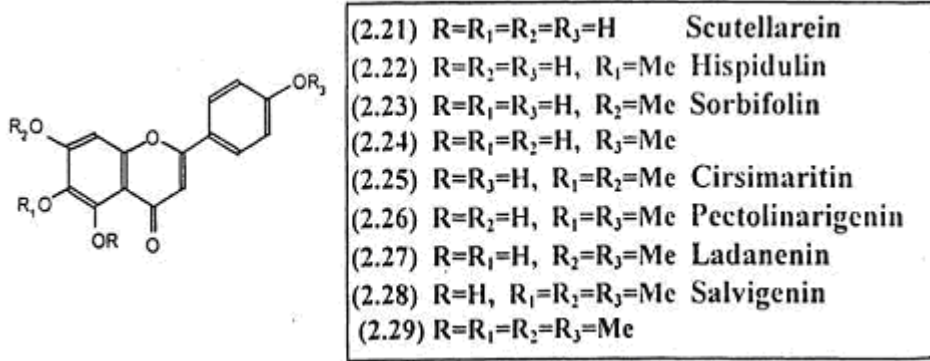
Tri-O-substitue flavonlar, di-O-substitue flavonlara göre doğada daha yaygındır. Bu flavonlardan 5,6,7-trihidroksiflavon (baicalin) (şekil 2.13) bitki türlerinde tespit edilmiştir. Baicaleinin 6-metoksi- (şekil 2.13- (2.10) ve 6,7-dimetoksi türevleri (2.10), 5,6,7-trimetoksi- (2-14) türevleri izole edilmiştir.



Şekil 2.13: Tri-O-substitue Flavonlar

2.3.1.4. Tetra-O-substitue Flavonlar

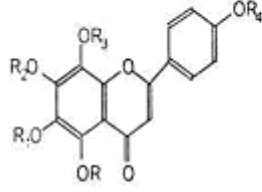
Değişik pozisyonlarda tetrahidroksillenmiş flavonlar ve metoksi türevleri bitkilerde yaygındır. Ancak, mümkün olan tüm pozisyonlarda, tetrahidroksillenmiş flavonların hepsi henüz bitkilerden elde edilememiştir. Örneğin, 5,6,7,8-tetrahidroksiflavon günümüze kadar incelenmiş olan bitkilerden elde edilememiştir. Fakat bu bileşiğin metoksillenmiş türevlerinden 5-hidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon (alnetin) ve 5,6,7,8-tetrametoksiflavon izole edilmiştir (Şekil 2.14)



Şekil 2.14: Tetra-O-substitue Flavonlar

2.3.1.5. Penta-O-substitue flavonlar

Penta-O-substitue flavonlar çoğunlukla *Asteraceae* ve *Lamiaceae* familyalarının çeşitli türlerinde bulunmuşlardır. Günümüze kadar bitkilerden izole edilen, pentahidroksiflavonların sayısı çok fazla değildir. Fakat, pentahidroksiflavonların farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri bitki aleminde yaygındır. Ancak, 5,6,7,8,4'-pentahidroksiflavonun (Şekil 2.15) farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri çeşitli bitkilerden izole edilmiştir. [29]

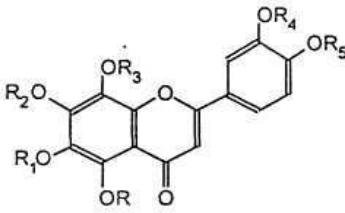


- (2.41) $R=R_1=R_2=R_3=R_4=H$
 (2.42) $R=R_2=R_4=H, R_1=R_3=Me$
 DesMe-sudachitin
 (2.43) $R=R_1=R_4=H, R_2=R_3=Me$ Thymusin
 (2.44) $R=R_1=R_3=H, R_2=R_4=Me$
 (2.45) $R=R_4=H, R_1=R_2=R_3=Me$ Xanthomicrol
 (2.46) $R=R_3=H, R_1=R_2=R_4=Me$ Pedunculin
 (2.47) $R=R_2=H, R_1=R_3=R_4=Me$ Nevadensin
 (2.48) $R=R_1=H, R_2=R_3=R_4=Me$
 (2.49) $R=H, R_1=R_2=R_3=R_4=Me$ Gardenin B
 (2.50) $R=R_1=R_2=R_3=R_4=Me$ Tangeretin

Şekil 2.15: Penta-O-substitue flavonlar

2.3.1.6. Hekza-O-substitue Flavonlar

Günümüze kadar hekza-O-substitue flavonların hidroksi türevlerinden hiç biri bitkilerden izole edilememiştir. Ancak bunların farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri bitkilerde bulunmuştur. 5,6,7,8,3,4'-Hekzahidroksiflavon (şekil 2.16) doğada bulunmamıştır. Ancak, bunun farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri çeşitli bitki türlerinden izole edilerek teşhis edilmiştir.[29]

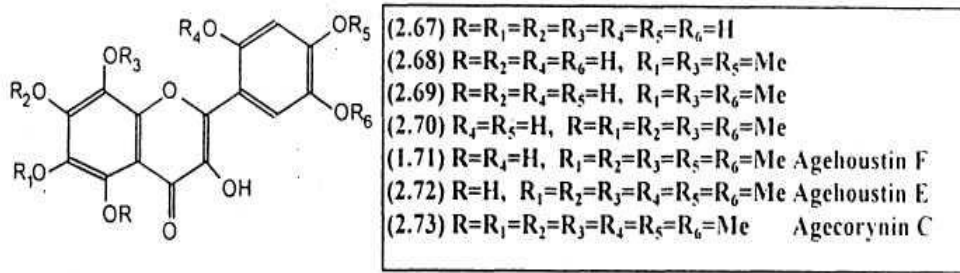


- (2.51) $R=R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$
 (2.52) $R=R_2=R_3=R_4=R_5=H, R_1=Me$
 (2.53) $R=R_2=R_4=R_5=H, R_1=R_3=Me$
 (2.54) $R=R_1=R_5=H, R_2=R_3=Me$ Sideritiflavon
 (2.55) $R=R_2=R_5=H, R_1=R_3=R_4=Me$ Sudachitin
 (2.56) $R=R_2=R_4=H, R_1=R_3=R_5=Me$ Acerosin
 (2.57) $R=R_1=R_5=H, R_2=R_3=R_4=Me$ Thymomin
 (2.58) $R=R_5=H, R_1=R_2=R_3=R_4=Me$
 (2.59) $R=R_4=H, R_1=R_2=R_3=R_5=Me$ Gardenin D
 (2.60) $R=R_2=H, R_1=R_3=R_4=R_5=Me$
 (2.61) $R=H, R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=Me$
 (2.62) $R=R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=Me$ Nobiletin

Şekil 2.16: Hekza-O-substitue Flavonlar

2.3.1.7. Hepta-O-substitue Flavonlar

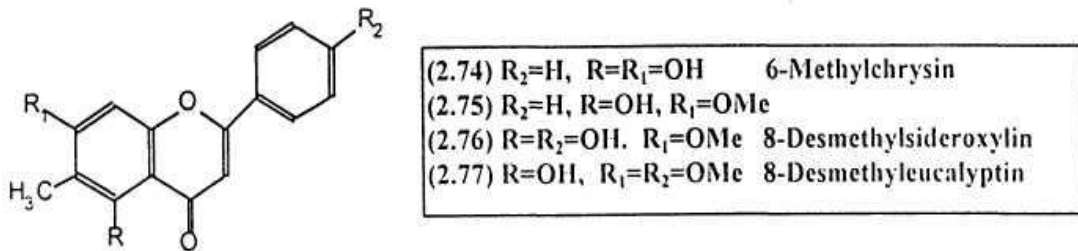
Hepta hidroksiflavonlardan henüz hiç biri doğada serbest halde bulunmamıştır. [29] Ancak 5,6,7,8,2',4',5'-heptahidroksi-, 5,6,7,8,3',4',5'-heptahidroksi ve 5,6,7,2',3,4',5'-heptahidroksiflavonların farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri bazı bitki türlerinden izole edilmiştir (Şekil 2.17)



Şekil 2.17: Hepta-O-substitue Flavonlar

2.3.2. C-Metilflavonlar

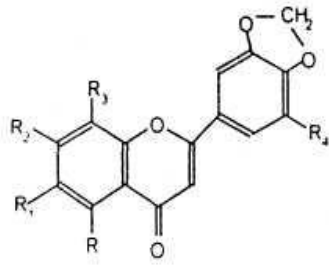
C-Metilflavonlar, O-substitue flavonların aril halkalarına bir veya iki metil grubunun doğrudan bağlanmasıyla oluşan flavon türevleridir. C-Metilflavonlar doğada çok da yaygın değildir. Günümüze kadar bitkilerden, yapısında farklı pozisyonlarda, yalnız bir veya iki metil grubu içeren flavonlar belirlenmiştir. Doğal mono-C-metilflavonların yapısında metil grubu genellikle, C-3, C-6 veya C-7 pozisyonlarından birinde yer alır. Bunlar arasında C-6-metilflavonlar çoğunluk oluştururlar. C-6 pozisyonu metillenmiş flavonlardan: 5,7-dihidroksi-6-metilflavon (6-methylchrysin), 5-hidroksi-7-metoksi-6-metilflavon, 5,4'-dihidroksi-7-metoksi-6-metilflavon (desmethyloxylidin), 5-hidroksi-7,4'-dimetoksi-6-metilflavon (8-desmethyleucalyptin) (şekil 2.18) çeşitli bitki türlerinden izole edilmiştir. [29,30]



Şekil 2.18: C-Metilflavonlar

2.3.3. Metilendioksiflavonlar

Metilendioksiflavonlar yapılarında metilendioksi grubu içeren O-substitue flavon türevleridir (Şekil 2.19). Bitkilerden elde edilen metilendioksiflavonların çoğunluğu, C-6/C-7 ve/veya C-3/C-4' pozisyonlarında metilendioksi grubu içerirler. Bugüne kadar tespit edilen metilendioksiflavonların sayısı fazla değildir. Doğal metilendioksiflavonlar genellikle, polioksijenlenmiş flavonların türevleridir.



- | |
|---------------------------------------|
| (2.78) $R=R_1=R_2=R_3=OMe$; $R_4=H$ |
| (2.79) $R=R_1=R_2=R_4=OH$, $R_3=H$ |
| (2.80) $R=R_1=R_2=R_3=R_4=OMe$ |
| (2.81) $R=R_1=R_3=R_4=OMe$, $R_2=OH$ |

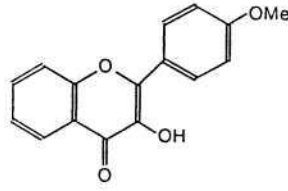
Şekil 2.19: Metilendioksiflavonlar

2.4. Flavonoller

Flavonoller, C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfıdır. Bunlar, C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzopiran çekirdeği içerirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır. Flavonoller, kristal veya amorf özellikli olup, flavonlar gibi açık sarı veya sarı renklidirler. Bu bileşikler genellikle oksijenli ortamda, flavonlara göre daha dayanıksızdırlar. Flavonolun farklı pozisyonlarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleri bitki aleminde daha yaygındır. Günümüze kadar bitkilerden 400'ün üstünde flavonol aglikon izole edilmiştir. Flavonoller de, flavonlar gibi yapılarında bulunan hidroksil ve/veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. [14,16,17]

2.4.1. Mono-O-substitue Flavonoller

Mono-O-substitue flavonoller doğada yaygın değildir. Bu bileşiklerden 4'-metoksiflavonol (şekil 2.20) çilek türlerinden izole edilmiştir.

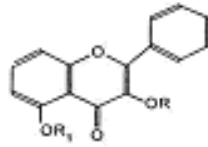


(2.92)

Şekil 2.20: Mono-O-substitue Flavonoller

2.4.2. Di-O-substitue Flavonoller

Günümüze kadar bitkilerden elde edilen di-O-substitue flavonollerin sayısı fazla değildir. Şekil 2.21 Di-O-substitue flavonolün yapısını göstermektedir.[14]

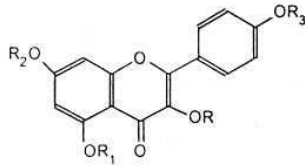


(2.93)	R=R ₁ =R ₂ =H	Galangin
(2.94)	R ₁ =R ₂ =H, R=Me	3-O-Metilgalangin
(2.95)	R=R ₂ =H, R ₁ =Me	
(2.96)	R=R ₁ =H, R ₂ =Me	İzalpinin
(2.97)	R ₁ =H, R=R ₂ =Me	
(2.98)	R=H, R ₁ =R ₂ =Me	
(2.99)	R=R ₁ =R ₂ =Me	

Şekli 2.21: Di-O-substitue Flavonol

2.4.3. Tri-O-substitue Flavonoller

Tri-O-substitue flavonollerin farklı pozisyonlarda hidroksillenmiş ve/veya metoksillenmiş türevleri doğada daha yaygındır. Şekil 2.22 tri-O-substitue flavonolün yapısını göstermektedir.[14]

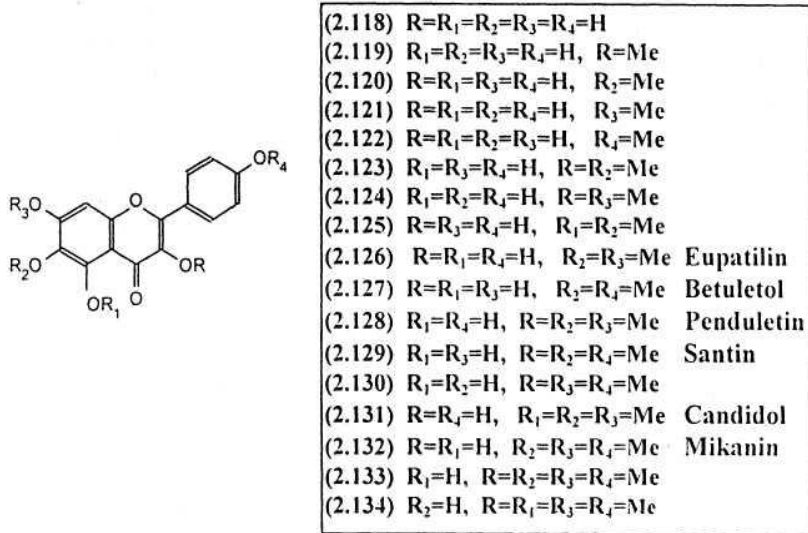


(2.107)	R=R ₁ =R ₂ =R ₃ =H	Kaempferol
(2.108)	R ₁ =R ₂ =R ₃ =H, R=Me	İsokaempferide
(2.109)	R=R ₂ =R ₃ =H, R ₁ =Me	
(2.100)	R=R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =Me	Rhamnocitrin
(2.111)	R=R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =Me	Kaempferid
(2.112)	R ₂ =R ₃ =H, R=R ₁ =Me	
(2.113)	R ₁ =R ₃ =H, R=R ₂ =Me	Kumatakenin
(2.114)	R ₁ =R ₂ =H, R=R ₃ =Me	
(2.115)	R=R ₁ =H, R ₂ =R ₃ =Me	
(2.116)	R ₃ =H, R=R ₁ =R ₂ =Me	
(2.117)	R ₁ =H, R=R ₂ =R ₃ =Me	

Şekil 2.22: Tri-O-substitue Flavonol

2.4.4. Tetra-O-substitue Flavonoller

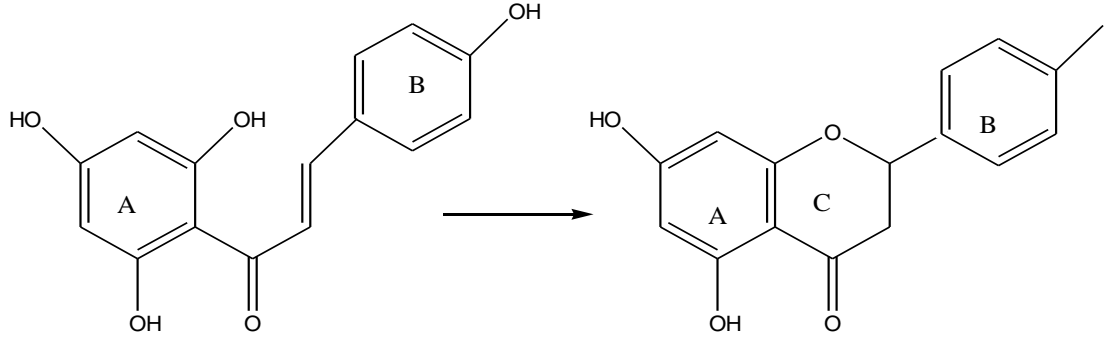
Flavonollerin bitkilerden elde edilen, farklı pozisyonlarda tetrahidroksillenmiş üyeleridir (şekil 2.23). Tetrahidroksi flavonollerin metoksi türevleri bitkilerde daha yaygındır. Ancak, bunun farklı pozisyonlarda metoksillenmiş türevleri çeşitli bitki türlerinden izole edilmiştir.[14,15]



Şekil 2.23: Tetra-O-substitue Flavonol

2.5. Kalkonlar

Kalkon 1,3-diarilprop-2-en-1-on iskeleti içeren tüm bileşikleri kapsar, bu bileşiklerin en belirgin karakteristik özelliği ise propan zincirinde olefinil bağ ve keto grubunun bulunmasıdır. Kalkonlar ve dihidrokalkonlar (kalkononlar), flavonoidlerin heterosiklik C halkasına sahip olmayan sınıfıdır. Kalkon yapısındaki A halkası biyosentetik olarak heterosiklik flavonoidlerin A halkasına, B halkası ise flavonoidlerin B halkası ile eşdeğer tutulabilir. Bu ilişkiye bir örnek olarak 2',4',6',4 tetrahidroksikalkonun (kalkononaringenin) 5,7,4'-trihidroksiflavanona dönüşmesi gösterilebilir (şekil 2.24).



Şekil 2.24: Kalkonun Flavona Dönüşümü

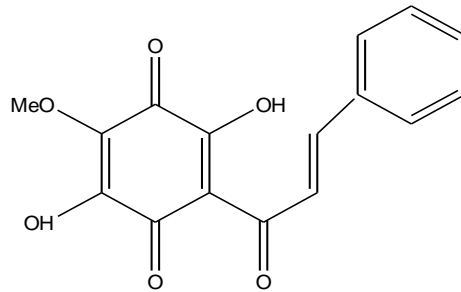
Kalkonlar 1,3-diarilprop-2-en-1-on iskeletine farklı gruplar bağlı olmasından dolayı birkaç gruba ayrılır.

2.5.1. Basit Kalkonlar

Basit kalkonlar, 1,3-diarilprop-2-en-1-on iskeleti içeren kalkon türevlerindendir ve de bitkilerde bol miktarda rastlanır. Bu grup kalkonların A ve veya B halkalarında –OH, –OCH₃ içeren çok sayıda türevleri mevcut olup, A halkasındaki O-substituentlerin (hidroksil ve/veya metoksil gruplarının) pozisyonuna bağlı olarak sınıflandırma yapmak mümkündür.[11,14,18]

2.5.2. Kinokalkonlar

Kinokalkonlar, temel kalkon iskeletinin A halkasında kinoid grubu içeren kalkonlarıdır. Kinokalkonların A halkasındaki karbonil grupları kinoid karboniller olarak adlandırılırlar. Kinokanlara bir örnek olarak şekil 2.25 deki pedisinin verilebilir.[14]



Şekil 2.25: Kinokalkon

2.6. Flavonoidlerin Tanınmaları

2.6.1. Renk Reaksiyonları

Günümüzde en çok kullanılan renk reaksiyonları kromatogramlardaki flavonoid lekesini doğrudan UV ışık altında ve yine bu lekenin NH_3 buharlarına ve NA (Naturstoffreagenz A) belirteci püskürttükten sonra UV ışık altında göstermiş olduğu renk değişikliğinin incelenmesidir. Bu yöntemle flavonoid bileşiğin tipi ve sübstütüsyonları hakkında kabaca ön bilgi edinmek mümkün olmaktadır (Tablo 2.2)

Tablo 2.2: Flavonoid Bileşiklerinin Renk Reaksiyonları

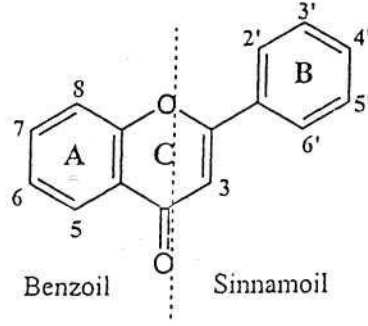
UV	UV/ NH_3	UV/NA	FLAVONOID BİLEŞİK
Koyu Mor	Koyu Mor	Koyu Mor	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH yok veya kapalı
Koyu Mor	Koyu Mor	Sari	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH kapalı, 3'-OH açık.
Koyu Mor	Sari	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH serbest, 3'-OH yok ya da kapalı.
Koyu Mor	Sari	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH açık.
Koyu Mor	Koyu kahverengi	Kahverengi	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3' ya da 4'-OH açık, 6-OH bulunabilir.
Koyu Mor	Koyu kahverengi	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH açığı, 6-OH bulunabilir.
Sari	Sari	Sari	Serbest 3 ve 5-OH var.
Sari	Sari	Turuncu-Kirmizi	3,5-OH açık, 3',4'-OH var.
Parlak floresans mavi	Parlak floresans mavi-yeşil	Mavi	5-OH yok ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı

2.6.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu

Ultraviyole spektral yöntemi az miktarlarda maddenin yeterli olduğu ve UV cihazı hemen her kimya laboratuvarında bulunduğu için flavonoid bileşiğin yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamasıyla en çok kullanılan bir yöntemdir.

Bileşiğin metanoldeki çözeltisinin spektrumu ve özel belirteçlerle bu spektrumda gözlenen kaymalar, bileşiğin ana iskeleti ile sübstütüsyon durumları hakkında geniş

bilgi verir (34). Flavonoid bileşiklerin çoğunun UV spektrumunda biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki büyük absorpsiyon bandı gözlenir. Bunlardan uzun dalga boyunda olanı flavonoid yapının B halkası ile ilişkilidir ve Bant I adını alır. Kısa dalga boyunda olanı ise A halkası ile ilişkilidir ve Bant II adını alır. (Şekil 4).



Şekil 2.26: Flavonoid Yapısı

Flavonoid bileşiklerde A ve B halkalarında hidroksil sayısı arttıkça bantlar uzun dalga boyuna doğru kayar. Hidroksil grupları (özellikle 3,5 ve 4' konumundakiler) metillendikleri ya da glikozitlendikleri takdirde bantlar hidroksil grupları serbest olan bileşiğe göre daha kısa dalga boyuna kayarlar.

2.6.3. NMR Spektrumu ile Flavonoidlerin Yapı Analizi

A halkası protonları

5,7-dihidroksi flavonlarda C6 ve C8 protonları 5.7-6.9 ppm arasında / değeri 2.5 Hz olan iki duplet olarak gözlenir. Eğer 5 ve 7 ye ilaveten 6 veya 8' de de sübstitüent varsa bu takdirde C6 ve C8 protonu 6-6.5 ppm arasında bir singlet olarak görülür. Flavon sadece 7-hidroksi grubu taşıyorsa bu durumda C6 protonu hem C8 deki hem C5 teki protonlarla orto ve meta etkileşmesinden /değeri 9 ve 2.5 Hz olan bir duplet-duplet halinde, C8 protonu ise / değeri 2.5 Hz olan bir duplet halinde 5,7-dihidroflavonlarda gözlenenden daha alt alanda çıkarlarken C5 protonu C6 protonuyla orto etkileşmesi ile / değeri 9 Hz olan bir duplet halinde 8 ppm civarında gözlenir.

B halkası protonları

4' den süstitüe flavonlarda B halkasının serbestçe dönebilmesine bağı olarak C2' ve C6 ile C3' ve C5' protonları orto etkileşimli / değeri 8-9 Hz olan iki duplet halinde 6.5-7.9 ppm arasında görölür. C3' ve C5' protonlarının dupletleri genellikle C2' ve C6 protonlarından daha üst alanda görölürler.

3', 4' disüstitüe flavonlarda C5' protonu /değeri 8.5 Hz olan bir duplet halinde 6.7-7.1 ppm arasında çıkar. C2' ve C6 protonlarından C2' protonu /değeri 2.5 Hz olan bir duplet halinde (meta etkileşim), C6' protonu ise hem orto hem meta etkileşimden dolayı *J* değeri 2.5 ve 8.5 Hz olan bir duplet duplet halinde görölür, ancak C2' ve C6' bantları birbirinin üzerinden aştıklarından genellikle 7.2-7.9 ppm arasında bir multiplet olarak gözlenirler. Flavonlarda C halkasındaki C3 protonu yaklaşık 6.3 ppm civarında keskin bir singlet halinde gözlenir.

Metoksi Protonları

Genellikle 3.5-4.1 ppm arasında çıkarlar. Farklı dötoro çözücülerde alınan spektrumlarda 3, 6 ve 8 konumlarındaki metoksi grupları çok az kayarken 3',4',2' ve 7 konumlarındaki metoksi grupları üst alana doğru 0.35-0.70 ppm lik bir kayma göstermişlerdir. En büyük kayma 7 yerindeki metoksi grubu için gözlenir.

2.7. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri

Flavonoid bileşikler antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuvar, antitümör, östrojenik, insektisidal ve antispazmolitik ajanlar olarak önemli rol oynarlar. Limondaki flavon bileşenlerin karışımı kortizon veya ACTH dan daha yüksek antienflamatuvar aktivite göstermiştir.[15]

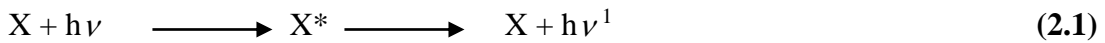
19. yy' dan beri Avrupa' da diyareye karşı galangin, myricetin, kamferol ve kersetin flavonlarını içeren bileşiklerin kullanıldığı bilinir. Rutin (özellikle 3-hidroksimetil rutin) hemoroid, katarakt, varislerin ve diğer kapiller problemlerin tedavisinde hala kullanılmaktadır. Benko farelerde bazı şişkinlik ve beyin ödemlerinin günde 50 mg/kg dozca rutin veya hesperidin verilerek çok azalttığını gözlemiştir. *Centaurea cyanus*'dan elde edilen apigenin-4'-glukozit-7-glukuronoid gibi bazı flavonoidler bir co-pigment gibi rol oynarlar. Apigenin ve 6-OCH₃ apigenin gibi C-6 da OCH₃ taşıyan flavonoidler ile volkensiflavon, morelloflavon gibi bazı flavonoidlerin antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

2.8. Moleküler Floresans Spektroskopisi

Optik yöntemlerden biri olan moleküler floresans spektroskopisi, spektrofotometri ile yakından ilgili bir analitik yöntemdir.

2.8.1. Floresans Spektroskopisinin Teorisi

Üzerine uygun dalga boyunda bir ışın yollanan molekül bunu 10^{-15} saniye gibi çok kısa bir sürede absorblamakta ve ekzite duruma geçmektedir.[10] Bu kararlı bir durum değildir. Ekzite haldeki molekül fazla enerjisinin bir kısmını ya da tamamını kaybetmeden ancak 10^{-7} - 10^{-8} saniye kadar bu halde kalabilir. Ekzite durumdaki bir çok molekül fazla enerjilerini komşu moleküller ile çarpışarak ısısal dağıtma ile harcar. Bazı moleküller ise bu fazla enerjilerinin bir radyasyon yayarak harcar ve temel duruma dönerler. Absorbe edilmiş ışının yeniden yayılması genel olarak fotoluminesans veya lüminesans olarak tanımlanır. Fotoluminesans, floresans veya fosforesans yayma olmak üzere iki şekilde olabilir. [16]

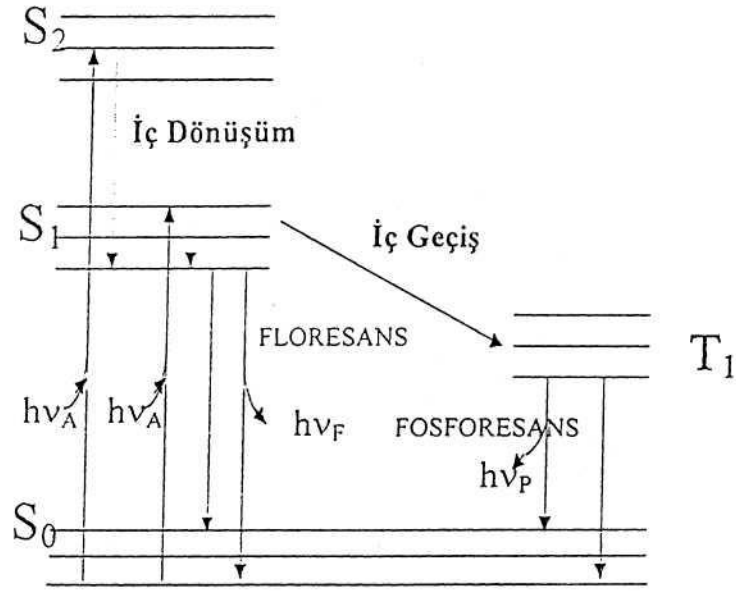


Yöntemin en önemli üstünlüğü absorpsiyon yöntemine kıyasla daha az miktarlardaki maddelerin analizinin yapılabilmesi yani duyarlılığıdır.

Ayrıca floresans gösteren maddelerin çok fazla sayıda olmaması yöntemin seçiciliğini diğerlerine kıyasla artırmaktadır. Fakat diğer taraftan bu son özellik yöntemin uygulama alanını sınırlı tutmaktadır.

2.8.2. Floresans Oluşumunun Prensipleri

Temel seviyedeki bir organik molekül, S_0 olarak olarak adlandırılan singlet temel elektronik durumda bulunur [10,11]. Uyarılmış singlet durumda, yüksek enerji orbitalindeki bir elektron ile düşük enerji orbitalindeki ikinci bir elektron zıt spin yönelimlerine sahiptirler. Singlet durumu belirleyen zıt spin yönelimli bu elektronlara “çiftlenmiştir” denir. Floresans ışık ile uyarılan aromatik bir molekülün, birinci uyarılmış singlet uyarılmış durumdan ışıma yapması olayıdır.



Şekil 2.27: Jablonski diyagramı

Şekil 1'de temel 1. ve 2. uyarılmış elektronik seviyeler S_0 , S_1 ve S_2 ile gösterilmiştir. Floresans özellik gösteren molekülü tanımlayan florofor, uyarıldığı herhangi bir elektronik enerji seviyesinin 0., 1., 2.,...vs titreşim enerji seviyelerinden birinde bulunur. Singlet uyarılmış durumdan singlet temel duruma dönüş, zıt yönelimli elektronların yönelimlerini değiştirmelerini gerektirmezken, triplet durumda bu zorunludur. Ekzite triplet durumda elektronlardan birinin spinini yön değiştirir. Aynı kuantum sayılı (aynı spin yönelimine sahip) iki elektron bir orbitalde bulunamayacağından yeni bir orbitale yükselir. Eskite triplet durumda elektronların spinleri çiftleşmemiştir yani aynı spin yönelimine sahiptirler. Triplet seviyedeki elektronlar yaklaşık 10^{-13} saniyede ekzite singlet durumun en düşük enerjili vibrasyonel seviyesine inerler. Molekülün ve dış koşulların durumuna bağlı olarak temel duruma dönme radyasyonsuz ya da bir radyasyon yayarak olabilir. Radyasyon yayma da floresans veya fosforesans yayma olmak üzere iki farklı şekilde olabilir.

Molekülün temel hale geçişte seçtiği yol ekzite halin en kısa süreli olduğu yoldur. Yani eğer floresans yayma deaktivasyon işlemi radyasyonsuz yola kıyasla daha çabuk oluyorsa molekül floresans yayar. [10,31]

Radyasyonsuz yol daha hızlı ise ışın yayma ya çok azdır veya yoktur. Eğer ekzite singlet hal nispeten dayanıksız ise molekül temel duruma genellikle radyasyon yaymaksızın döner. [14,16]

Radyasyon yaymaksızın ortaya çıkan başlıca enerji kaybı işlemleri şunlardır:

- 1- Titreşimsel dinlenme (vibrational relaxation = VR)
- 2- İç dönüşüm (internal conversion = IC)
- 3- Sistemler arası geçiş (intersystem crossing=ISC)
- 4- Enerji nakli (energy transfer)

1- Titreşimsel Dinlenme: ekzitasyon işlemi ile herhangi bir vibrasyonel seviyeye yükselme olabilir. Çözeltide ekzite haldeki moleküller ile çözücü moleküllerinin çarpışması sonucu vibrasyonel enerjinin fazlası derhal kaybedilir ve ekzite halin en düşük enerji seviyesine geçiş olur.

2- İç Dönüşüm: İki elektronik durumun vibrasyonel seviyelerinin aynı olması halinde iki ekzite halin potansiyel enerjileri aynıdır. Bu durumda aynı enerjili vibrasyonel seviyeler arasında bir geçiş olur.

3- Sistemler arası geçiş: Ekzite singlet durumdan triplet duruma geçişlerdir. Bu işlem sırasında elektronun spini döner. İç dönüşümde olduğu gibi iki durumun vibrasyonel enerjilerinin aynı olması halinde gerçekleşir.

4- Enerji nakli: bu işlem ekzite durumdaki bir molekülün fazla enerjisini bir alıcı moleküle doğrudan doğruya ve ışınsız bir şekilde aktararak normal duruma dönmesidir. Enerji nakli aynı zamanda bir molekülde birbirinden uzaktaki iki kromofor grup arasında da ortaya çıkabilir.

Bu dört işlem de fluoresans yaymayı engelleyicidir.

Radyasyon yayarak ortaya çıkan başlıca enerji kaybı işlemleri şunlardır:

1-Floresans yayma

2-Fosforesans yayma

1- Floresans yayma: Molekül eğer nispeten daha dayanıklı bir eksite singlet durumda ise eksite singlet durumun en düşük vibrasyonel seviyesinden temel elektronik hale dönüş floresans yayma ile olur (Şekil 2). Düşük konsantrasyonlarda, düşük sıcaklıkta ve yoğun çözücülerde çalışılarak eksite singlet durum daha dayanıklı hale getirilebilir. Bunun sonunda çarpışma ile olan enerji kaybı azaltılarak floresans yayma arttırılabilmektedir. [17, 32]

Eksite singlet halin vibrasyonel seviyelerine eksite olmuş bir molekül önce radyasyon yaymaksızın vibrasyonel dinlenmelerle bu durumun en düşük vibrasyonel seviyesine indiği ve sonra floresans yaydığı için, floresans yayma ile sonuçlanan geçişler absorpsiyon geçişlerinden daha düşük enerjilidir. Bu nedenle floresans ışının dalga boyu absorbe edileninkinden daha uzun olmakta yani emisyon spektrumu eksitasyon spektrumundan daha uzun dalga boyunda ortaya çıkmaktadır. Bazı özel durumlarda ise temel halin bazı üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan moleküllerde olabilir. Enerji diyagramında görüldüğü gibi böyle bir seviyeden S_1 haline eksitasyon (a) ve buradan temel durumun en düşük enerji seviyesine dönüş iz (b) mümkün olabilir. Bu durumda ise eksitasyon spektrumunun en uzun dalga boyundan daha kısa dalga boyunda floresans yayılması nedeniyle eksitasyon ve emisyon spektrumlarında çakışmalar gözlenebilir. Antrasenin eksitasyon ve emisyon spektrumlarında 378 nm deki pik bu şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 3). Diğer taraftan eksite ve temel durumlarda vibrasyonel enerji seviyeleri dağılımları hemen aynı olduğu için floresans radyasyonunun spektrumu eksitasyon spekt-

bir ayna hayali görünümünde ortaya çıkmaktadır. Antrasenin eksitasyon spektrumunda 250 nm deki kuvvetli absorpsiyon bandı $S_0 \rightarrow S_x$ geçişi nedeniyle. S_2 veya daha yüksek elektronik seviyelere çıkan moleküllerin hepsi ışın yaymaksızın S_1 durumunun en alt seviyesine dönmekte ve buradan floresans yaymaktadır. Bu nedenle emisyon spektrumunda 250 nm deki pike eşdeğer bir pik bulunmamaktadır.

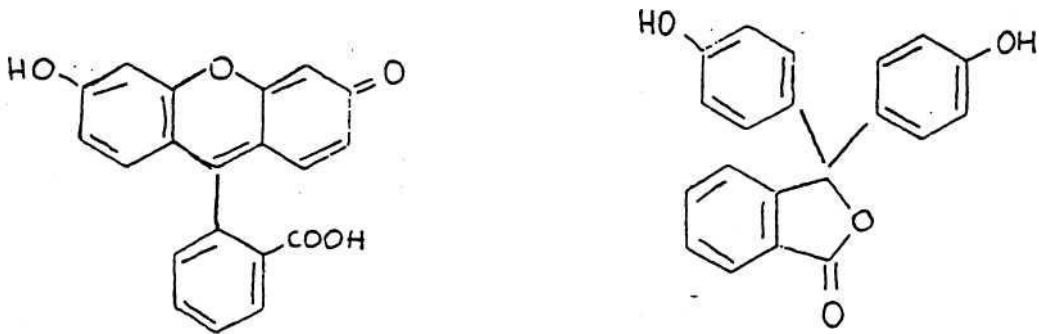
Fosforesans yayma: Molekölün daha da dayanıklı bir eksite singlet durumda olması halinde önce singlet halden triplet duruma bir sistemler arası geçiş olur ve daha sonra temel duruma geçiş, fosforesans yayma ile olur. Eksite triplet durumun en düşük enerji seviyesi en uzun ömürlü olan haldir. Dış koşullara bağılı olarak buradan ya fosforesans yayma veya moleküller arası çarpışma ile temel duruma geçiş olur.

2.8.3.Floresansı Etkileyen Faktörler

Bir bileşiğin floresans gösterip göstermemesi ve floresans ışının şiddeti hem molekül yapısı hem de kimyasal çevreye bağılı olmaktadır.[10,14,16]

2.8.3.1. Yapısal faktörler

Bir molekülün floresans gösterebilmesi için ilk koşul UV veya. görünür alandaki radyasyonun absorblanmasıdır. Bu absorblama ne kadar kuvvetli olursa yayılan floresansın şiddeti de o kadar kuvvetli olur. En düşük enerjili elektronik geçişleri olan moleküllerin hem değerleri hem de floresans etkinlikleri yüksek olmaktadır.Basit alifatik yapılı bileşikler absorbladıkları enerjiyi ışın yaymaksızın harcarlar ve floresans göstermezler. Ketonlar, aldehidler, karboksilli asidler, amidler, esterler gibi bağılı heteroatom içeren ve en düşük enerjili geçişleri olan bileşikler genellikle absorbladıkları enerjiyi iç dönüşüm şeklinde ve az floresans gösterirler. Polienler ve aromatikler ile bunların tümü ise floresans gösteren bileşiklerdir, özellikle bunlardan düzlemsel ve yapıda olanların floresans etkinliği en yüksektir[32].



Şekil 2.28: Floresans Gösteren Bileşikler

Benzenin kendisi zayıf fluoresans özellik gösterip üzerindeki süstitüye grupların varlığı fluoresansı olumlu veya olumsuz yönde etkiler. Örneğin orta ve para yönlendiricilerden –OH, NH₂- NHR, -NRR', -OR gibi süstitüentler fluoresansa ya etkili olmazlar veya arttırlar. –COOH, -NO, RCO.- CHO, -N=N, -I,-Br,-Cl gibi meta yönlendiricileri ise fluoresansı azaltıcı etki gösterirler [31].

2.8.3.2.Sıcaklık ve viskozite

Bir çok molekülün fluoresansı sıcaklığın artması ile azalır. Sıcaklığın ve çözücünün viskozitesinin azalması, eksite molekül ile diğer moleküllerle çarpışması ve ayrıca sistemler arası geçişlerin olasılığını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli ortamda ise dinlenme zamanı eksite durumun ömrün-daha uzun olmakta ve fluoresans artmaktadır. [10,32]

2.8.3.3. Çözücü

Kullanılan çözücüler fluoresans şiddetinin veya fluoresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle eksite durumdaki moleküller ile "hidrojen bağı oluşturmaları temel hale radyasyonsuz dönüş işleminin arttırdığından fluoresansın şiddetinde azalma olur. Bu nedenle -OH, -COOH, gibi hidrojen bağı oluşturabilecek gruplar içeren maddelerin analizinde çözü-cü seçiminde dikkatli olunmalıdır. Örneğin, 5-OH kinolinin izopentandaki fluoresans etkinliği değeri 0.3 iken dimetilsülfoksitte 0,07 ye düşmektedir.

Bir veya daha çok sayıda ağır atom içeren çözücüler, sistemler arası geçiş olasılığını arttırdıklarından fluoresansı azaltırlar. Karbontetraklorür, etilyodür gibi çözücüler triptlet oluşumu arttırdıklarından fosforesansı arttırırlarken fluoresansı azaltırlar.

Çözücünün polaritesi fluoresansın şiddetinden çok dalga boyunu etkiler, genellikle polaritenin artması ile fluoresans emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kayar.Örneğin, eksitasyon maksimumu 285 nm olan indolün emisyon maksimumları sikloheksanda 297 nm, benzende 305 nm, dioksanda 310 nm, etanolde 330 nm ve suda 350 nm dir.

2.8.3.4. pH

Asidik veya bazik grub içeren bir bileşiğin fluoresansı ortamın pH ma bağlıdır. Örneğin, nötr ortamda hem fenol hem metoksibenzen fluoresans gösterir, ortamda fenol fluoresans göstermeyen anyonuna dönüşürken metoksibenzen değişim göstermeden kalır. Anilin çözeltisi nötr ve bazik ortamda iken görünür alanca fluoresans gösterir. Çözelti asitlendirildiğinde bu fluoresans kaybolur. Diğer taraftan anilin pH a bağlı olmaksızın UV alanda fluoresans göstermektedir. Asid çözeltide azot atomu pozitif yük ile yüklenerek anilinyum iyonunu oluşturur. Bu Urumda amin grubu halka ile rezonansa girememekte ve bu nedenle anilinyum iyonu-nun rezonansı benzeninkiyle aynı olmaktadır. Nitekim benzen de UV alanda fluoresar . Diğer taraftan nötr ve bazik ortamda anilin üç ilave rezonans yapısı ve bunun sonucunda daha dayanıklı eksite singlet durumu oluşması nedeniyle fluoresans ışının dalga boyu daha uzun dalga boyuna kayar. Bu şekilde ortamın pH ma bağlı olarak fluoresans gösteren bileşiklerin asid baz titrasyonlarında endikatör olarak yararlanılabilir.[10]

2.8.4. Fluoresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişki

Bir maddenin fluoresans özellik gösterebilmesi için öncelikle üzerine gelen radyasyonu absorblaması gerekmektedir. Beer yasasına çözeltiden absorplanmadan geçen ışın fraksiyonu transmitasyon olarak tanımlanır ve T ile sembolize edilirse;

$$T = I_t / I_0 = e^{-abC}$$

I_0 =Gelen ışığın şiddeti

I_t = Geçen ışığın şiddeti

a:absorptivite

b: tabaka kalınlığı

C: konsantrasyon

Fluoresansın şiddeti maddenin fluoresansı ile ancak düşük konsantrasyonlarda doğru orantılıdır. Konsantrasyonun derişimi artıkça gelen ışının tümü tümü çözeltinin ilk tabakaları tarafından absorplanır, daha iç kısımlara ulaşamaz. Maddenin fluoresans şiddeti ile konsantrasyonu arasında düşük konsantrasyonlar için bir lineerlik göze çarpar. Absorbansın 0.05 den fazla olduğu konsantrasyonlarda doğrusallık bozulur.

Fluoresans ışının şiddeti gelen ışının şiddetine doğrudan bağlantılıdır, ancak bu durum belirli bir ışın şiddetine kadar geçerlidir. Gelen ışının şiddeti arttıkça fotodekompozisyon olabilir, ayrıca çözücü ve bazı kirliliklerden olan fluoresans da bu esnada artar. Işık kaynağının belirli bir şiddeti yoktur, bu yüzden fluoresans sinyallerinin mutlak değerleri yoktur. Bu sebeple fluoresan değerleri gerçek değerlerinden çok bağıl değerlerle ifade edilir. Ölçümler bazı standart maddelerin fluoresans şiddetine bağlı olarak yapılır.

Fluoresansın şiddeti molar absorptivite ile orantılı olduğundan eksitasyon ışınının dalga boyunun maksimum absorpsiyonun dalga boyunda olması gerekir. Tüm ölçümlerde eksitasyon kaynağı, çözücü, sıcaklık, pH gibi değerlerin aynı olması gerekir. Yayılan fluoresans ışını çözeltideki bileşenler tarafından absorbe edildiğinden dolayı absorpsiyonun şiddeti azalır bu olaya da söndürme (quenching) denir. Bu etki doğrudan doğruya maddenin kendisi tarafından da oluşturabilir, buna self quenching denir. Söndürmenin bir başka oluşum şekli de moleküllerin safsızlık olarak bulunan yabancı moleküller ile çarpışarak sonunda ışınsız enerji kaybı ile gerçekleşmesidir. Bu olaya da safsızlık söndürmesi (impurity quenching) denir. Ayrıca ortamda bulunan çözünmüş haldeki oksijen, ağır metaller, paramagnetikler sistemler arası geçiş hızını etkileştiklerinden sönmeye neden olabilirler. Fluoremetrik çalışmalar için hazırlanan bazı saf çözücüler sönmeye neden olan bazı etkileri önleyebilir. Sıcaklık, pH değişiminin yanı sıra maddenin uzun süre UV ışığına maruz bırakılması da fotokimyasal reaksiyona sebep olabileceğinden fluoresans azalır. [9,10,24]

2.8.5. Ekzitasyon ve Emisyon Spektrumları

Çift monokromatörlü bir spektrofotometre ile analiz edilecek maddenin eksitasyon ve emisyon spektrumu alınabilir. Bunun için örnek önce herhangi bir dalga boyundaki ışın ile eksite edilip maksimum emisyon gösterdiği dalga boyu saptanır. Madde çözeltisi ile dedektör rasındaki emisyon monokromatörü saptana maksimumda sabit tutulurken ışık kaynağı ile madde çözeltisi arasındaki eksitasyon monokromatörü 200 nm yakınlarından başlanarak otomatik olarak değiştirilir. Bu şekilde yazıcıdan çizilen, maddenin eksitasyon spektrumudur.

Daha sonra eksitasyon monokromatörü eksitasyon spektrumundan saptanan maksimum dalga boyunda tutulurken , emisyon monokromatörü değiştirilir. Böylece maddenin emisyon spektrumu elde edilir. [17,32]

Eksitasyon spektrumu, eksitasyon dalga boyu ile fluoresans ışınındaki değişmelerin kaydedilmesi ile alınır. Emisyon spektrumu ise fluoresans yayımının spektral dağılımıdır. Analitik uygulamalarda emisyon spektrumu kullanılmaktadır. Ancak analiz edilecek maddenin en uygun eksitasyon dalga boyunun saptanması için eksitasyon spektrumunun alınması uygundur. Maddenin eksitasyon spektrumu absorpsiyon spektrumu ile aynıdır. Maddenin fluoresans yayma ile kaybettiği enerji, absorpsiyon ile kazandığı enerji, absorpsiyon ile kazandığından daha az olduğunda emisyon spektrumu eksitasyon spektrumuna kıyasla daha uzun dalga boyunda ortaya çıkar. Filtreli fluoremetreler ile çalışırken uygun filtreler ile çalışılması gerekir. Bunun için örneğin çalışılacak konsantrasyonda bir çözeltisinden ve boş denemenin fluoresansı çeşitli primer filtreler denenerek ölçülür. Boş deneme için en düşük, örnek için en yüksek fluoresansın ölçüldüğü filtre saptanır. Bu seçilen primer filtre ile bu defa sekonder filtreler değiştirilerek en yüksek fluoresansın okunduğu filtre saptanır.

2.8.6. Organik maddelerin spektrofotometre cihazı ile analizi

Fluoresans gösteren bir maddenin yaydığı ışının maksimumdalga boyu o madde için madde karakteristik olduğundan fluoresans analizleri ile maddelerin kalitatif analizi mümkün olmaktadır. Kantitatif analizler ise belirli bir konsantrasyon aralığında fluoresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişkin doğrusal olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Fluoresans özellik gösteren fakat örnekteki miktarları çok az olduğundan kolorimetrik veya sprktrofotometrik yöntemler ile tayin edilemeyen pek çok madde, çok düşük konsantrasyonlardaki çözeltilerinden fluorometrik yöntem ile tayin edilebilir[32].

Bu yöntemin hassasiyeti ve seçiciliği pek çok biyolojik maddenin kompleks karışımlardan dahi analizine olanak sağlar. Fenilalanin gibi bazı aromatik yapıdaki maddeler fluoresans gösterirken , fluoresans göstermeyen asid ve proteinler uygun maddeler ile türevlendirilerek analiz edilebilirler. Örneğin fenilalanin gibi fluoresans özelliği az olan bir madde ninhidrin ve Cu II ile türevlendirilerek kuvvetli fluoresans

özellik gösteren hale gelebilir. pH'a bağlı olarak farklı şiddette floresans gösteren pirimidin, purin ve nukleik asitler de direkt olarak veya türevlendirilerek analiz edilebilirler. Fluorimetrimin kullanıldığı başka bir alan ise enzim kinetiği ve mekanizma çalışmalarının aydınlatılması, enzimlerin kalitatif ve kantitatif analizleridir.

Kan, idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunan etken madde ve bunların metabolitleri eser miktarda bulunduğundan dolayı, ilaç absorpsiyonu, metabolizması ve atılımının hızının araştırıldığı çalışmalarda floresans analizlere oldukça sıkça başvurulur.

Floresans gösteren iki maddeden analiz edilecek olan diğerinden farklı dalga boyundaki ışını absorplıyorsa , eksitasyon filtresinin ayarlanması ile sadece bu maddenin analizi mümkün kılınır. Her iki madde aynı alanda absorplama yapıyor fakat farklı alanda floresans yayıyorsa, emisyon iltresi veya monokromatör ayarlanarak sadece analiz edilmek istenen maddenin analizi saptanabilir. Bazı kompleks karışımların fluoremetrik ölçümleri sadece eksitasyon ve emisyon dalga boylarının değiştirilmesi ile gerçekleştirilemez. Yakın dalga boylarında floresans yayın bir çok maddenin yanında analiz edilecek maddenin floresansının ölçülmesi, belirli bir kromatografik ayırma yönteminin ardından gerçekleştirilir. Bir çok organik maddenin tanınması yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi tekniklerle ayrılmalarından sonra gerçekleşmektedir.

2.9. Uyarılmış Seviye Molekül içi Enerji Aktarımı (ESIPT)

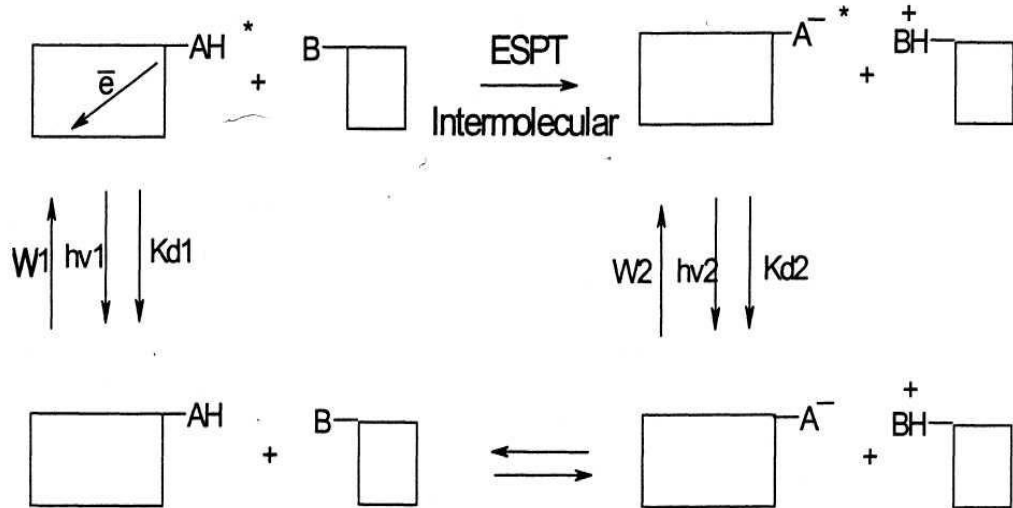
İki ya da daha fazla floresans emisyon bandı veren sistemlerin oluşturulması bazı koşulların sağlanmasını gerektirmektedir. Bunlardan bir tanesi farklı dalga boylarında floresans yayılma veren temel veya uyarılmış seviye reaksiyonlarının gerçekleşmesidir. Bunun için prob molekülü uyarılmış seviye reaksiyonlarından birini sergilemelidir. Olası reaksiyonların sayısı sınırlıdır, bunlardan biri temel seviyeden uyarılmış seviyeye geçişte bir izomerizasyonun gerçekleşmesidir.,

Bu, uyarılmış seviyedeki molekülün yapı konfigürasyonunun farklı olduğu ikinci bir molekülün de oluşması anlamına gelmektedir. Yani sentezlenmiş olan 3HK (3-hidroksikromon) türevi problemlerin konfigürasyonel izomerizasyonu söz konusu değildir, çünkü kromon halkası dönüşlere izin vermeyecek özelliktedir. [10,12,13]

Molekölün izomerizasyonuna ek olarak iki yayılım bandı eldesine imkan tanıyan diğeri bir reaksiyon, Uyarılmış Seviye Molekölüçi Elektron Aktarımı reaksiyonudur (ESIPT). Uyarılmış Seviye Molekölüçi Elektron Aktarımı reaksiyonları iki şekilde gerçekleşebilir.

1-Intermoleküler

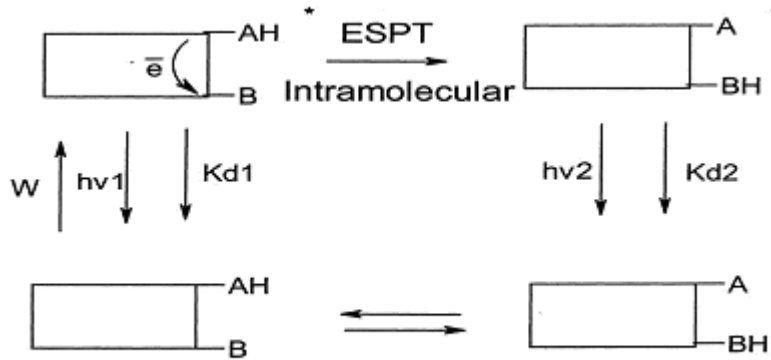
Dipol moment farkı yaratarak yük transferi ile gerçekleştiren proplar, uyarılmış seviyedeki prob molekülünün iki bölgesi arasındaki elektron yoğunluğu farkı fazla olabilmektedir. Bir bölgesi elektronca fazla yüklü iken diğeri zayıf olabilir. Böyle bir durumda uyarılmış seviyede elektron yoğunluğu fazla olan bölgeden az olana bir elektron akışı söz konusudur. Elektron, yüklü bir parçacık olduğundan molekülün dipol momentini büyük ölçüde değiştirir. Büyüyen dipol momenti ortamla daha güçlü etkileşir ve etkileşimdeki bu değişim yayılma grafiğinin kaymasına sebep olur, bu da iki bantlı floresans yayılmasına sebep olur. MoleküllerYük transferi gerçekleştiren proplara örnek olarak ANS (8-anilinonaphthalenesulfonic) asit verilebilir. [19]



Şekil 2.29: Intermoleküler ESIPT Reaksiyonu

2-Intramoleküler

Bir diğer ESIPT reaksiyonu olan intramoleküler Uyarılmış Seviye Moleküllü Elektron Aktarımı reaksiyonunda molekül içi donör ve akseptörler arasında proton aktarımı gerçekleştiren problemler söz konusudur. [19,24]



Şekil 2.30. Intramoleküler ESIPT Reaksiyonu

Bu tip Uyarılmış Seviye Moleküllü Elektron Aktarımı reaksiyonu veren maddelere örnek olarak 3-Hidroksiflavon ailesi gösterilebilir.

Proton aktarımının gerçekleşebilmesi için proton aktarımı sonucu oluşan tautomerik formun uyarılmış seviyedeki (T^*) enerjisi ile normal formun uyarılmış seviyedeki (N^*) enerjisi karşılaştırılabilir yakınlıkta olmalıdır. Temel seviyede gerçekleşen proton aktarımı sonucu oluşan T^* formun dipol momenti N^* formundakinden daha küçüktür ve bunun sonucu bu forma ait floresans bandında çözücüye bağlı oluşan kayma N^* formu ile oluşana göre daha düşüktür.

ESIPT sonucu iki bantlı floresans yayılma veren floresans problemlerin taşınması gereken özellikler vardır. Bunlardan en önemlileri; Çalışmayı elverişli kılacak yükseklikte kuantum verimi, iki iyi ayrılmış floresans yayılma bandı, iki bandın ışık şiddeti oranının karşılaştırılabilir olması, floresans yayılması sonucu elde edilen iki bandın floresans parametrelerinin birbirinden bağımsız olmaları ve bunun sonucu çok parametrelili bir analize imkan tanımasıdır. [16,18,26]

İstenen tüm bu özellikleri potansiyel olarak sağlayan florofor ailesi 3HF'lardır. Bu aile normal uyarılmış durum (N^*) ve de foto-tautomer (T^*) reaksiyon ürünü veren iki emisyon bandının uyarılmış durum intramoleküler proton transferi (ESIPT) yapma özelliği gösterir. İkinci bant çarpıcı bir şekilde yüksek dalga boyuna kayarak birbirinden ayrı iki tane emisyon yapan bant gözlenir. Bu iki bandın şiddetleri arasındaki oranlar farklı perturbasyonlara karşı oldukça duyarlıdır. Bu yüzden 3HF türevlerinin ters miseller, fosfolipid ve doğal membranlar alanında kullanımları oldukça yaygındır [10]. 3HF kromoforlarının spektroskopik özelliklerini artırmak amacıyla yeni stratejiler geliştirilmektedir. Absorpsiyonun, floresan spektrumunun yüksek dalga boyuna kaydırılması, kuantum veriminin artırılması ve de istenilen aralıktaki çift dalga boyu hassasiyetinin artırılması yapılan çalışmalar arasındadır.

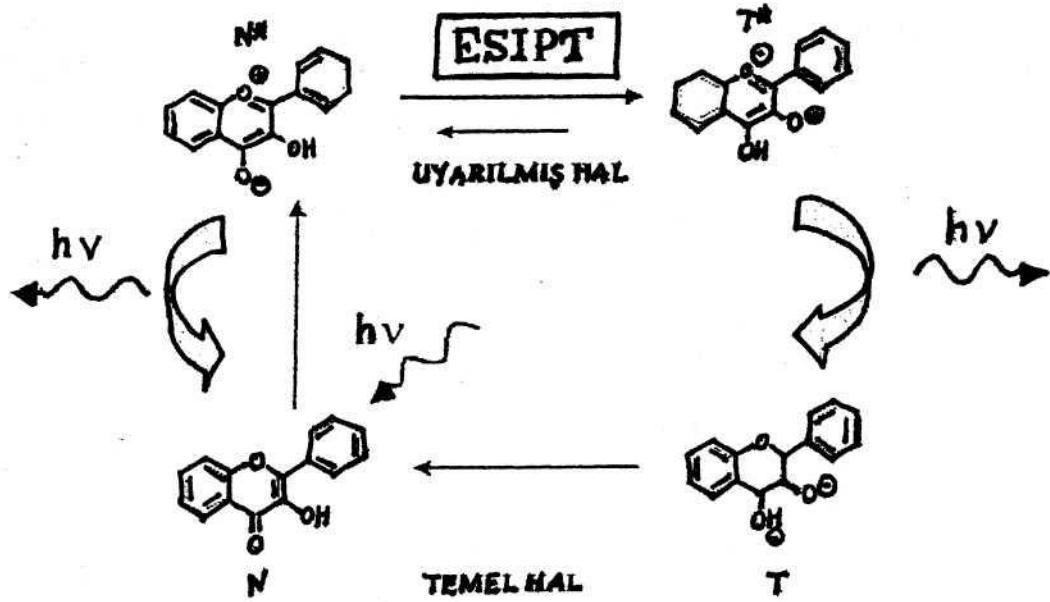
3 HF kromoforunun en farklı özelliği ise çevresinde gerçekleşen durumlara anında verdiği tepkilerdir. Uyarılmış durumda heterosiklik π elektronik sistemi yük dağılımında yüksek bir asimetric artışa sebep olur. Bu durum da solvotromik ve elektrokromik boyaların floresan spektrumunda kaymalara sebep olur, ancak N^* ve T^* gibi iki farklı emisyon bandı olduğundan dolayı mikro çevrelerinde gerçekleşen polarite ve elektrik alan perturbasyonlarından etkilenme duyarlılıkları farklıdır. Düşük kararlıkta hidrojen bandı oluşturan beş zincirli halkadaki 3-hidroksil ve 4-karbonil grupları ESIPT reaksiyonunun yoğunlaştığı bölgedir. Kromofor ve ESIPT reaksiyonunun asimetric yapısından dolayı çevrenin ve belirli bir elektriksel alanın anizotropik özellikleri floresan spektrumunu etkiler. Membran içerisinde kromofor gruba belirli bir lokasyon veya oryantasyon sağlanmadığı takdirde yapılan çalışmalar anlamlı olmaz. Kromofor grubun katman içerisinde yerleşebileceği en iyi nokta pozitif yüklü gruptur. Proben kararlılığını artırabilmek için yapılabilecekler arasında probun özelliğini lipid yapının özelliğine benzetmek üzere probun yapısına farklı uzunluklarda hidrokarbon zincirleri yerleştirmek olacaktır. [25,27,32]

2.9.1. 3-Hidroksiflavonların ESIPT Reaksiyonları

ESIPT reaksiyonu sonucu reaktan ve reaksiyon ürünü için iki farklı uyarılmış bölge yayını gözlenebilir. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant şeklindedir. Mavi bölgedeki bant normal uyarılmış durumdan (N^*) kaynaklanır. (Şekil 2.31) Önemli ölçüde kırmızıya kayan diğer bant ise uyarılmış tautomer durumdan (T^*) kaynaklanır. Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık gibi spektroskopik davranışlar 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve

onların mikro çevre parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. [18,19]

3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır. Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle 3-Hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların bazı türevleri, daha avantajlı fluoresans özelliklerinden dolayı misellerde, model membranlarda ve protein moleküllerinde kullanılmaya elverişlidir.



Şekil 2.31: 3-Hidroksiflavonların ESIPT Reaksiyonları

2.10. Fluoresans Problar

Problar genellikle fluoresans özellik gösteren organik yapılardır ve en uygun spektroskopik özellikler ile fonksiyonel performansı bir arada taşıdıkları ölçüde değer kazanırlar.

Floresans problar sıvı-sıvı ve sıvı-katı yüzeyler, proteinler, biyomembranlar ve onların fosfolipid modelleri, ince filmler (49), miseller ve ters miseller (50) gibi mikroskopik olarak heterojen sistemlerin incelenmesinde önemli bir araç haline gelmektedir. [14,32]

Floresans problar genelde aromatik heterosiklik bileşiklerdir. Suda zayıf çözünürlükleri ve hidrofobik bağlanma bölgelerine yüksek ilgileri vardır. Bunlar doğal ligandların ve ilaçların analoğu olabilir ya da çeşitli ligandlar ile gerçekleştirilen yarışım deneylerinde bağlanma bölgesi işaretleyicisi olarak görev alabilirler.

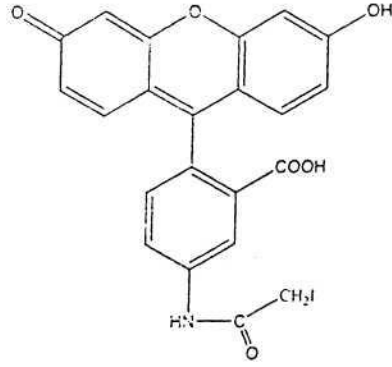
3HF türevleri de bu amaçla detaylı incelenmiştir. Ancak bu çalışmaların hiçbirinde yüksek özgünlük ve stokiyometrik bağlanma elde edilememiştir. Ayrıca bu problar içinde iki iyi ayrılmış floresans emisyon bandı veren ve değişik ortamlara yüksek hassasiyet gösteren özgün bir prob yer almamıştır. [14,19]

Bazı floresans maddelere örnekler:

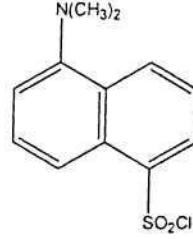
- a) Doğal floresans maddeler
- b) Yapay floresans maddeler



Şekil 2.32: Doğal Floresans Maddelere Örnekler



5-iyodoasetamit fluoresein



Dansil klorür

Şekil 2.33: Yapay Floresan Maddelere Örnekler

Elektron spektrumunda değişiklik gösteren probalar ratiometrik olarak adlandırılır. Çünkü bu probalar seçilen iki dalga boyunda ışık şiddeti oranının belirlenmesi ile emisyon spektrumundaki değişimlerin kantitatif olarak karakterize edilmesini sağlar.

Orantısal (Ratiometrik) probalar iki grupta sınıflandırılabilirler.[14]

1. Birinci grup orantısal (ratiometrik) etkili gruplar:

Etkileri spektrum kaymaları ile gözlemlenir. Genellikle bu kaymaların temelinde prob molekülünün uyarılmış durum elektronik yük transferi (ESCT) vardır. Bu ESCT çevredeki atom grupları ve moleküllerle probun etkileşimlerinin moleküler düzeydeki değişimleri tarafından indüklenir. Biyomembran potansiyeline duyarlı boyalar elektrokromik kaymalar gösterirken, polariteye duyarlı probalar solvatokromik kaymalara dayanır.

2. İkinci grup orantısal (ratiometrik) probalar:

İki ya da daha fazla banttan meydana gelen fluoresans spektrumu ve bu bantlar arasında ışık şiddeti değişimleri gözlemlenir. Bu, probun katılımıyla uyarılmış durum reaksiyonunun bir sonucu olarak meydana gelebilir.

2.10.1. 3-Hidroksi Flavonların Flouresans Prob Olarak Kullanımı

İkinci grup orantısal (ratiometrik) prob özelliği gösteren 3 hidroksi flavon türevleri mikro çevrelerinde meydana gelen ufak değişimlere karşı çok hassas olduklarından ve de bu değişimlere birbirlerinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt verdiklerinden dolayı oldukça popüler floresan sensörleridir.

Yeni geliştirilen 3-hidroksiflavon türevleri sahip oldukları 500 nm civarındaki mavi-yeşil ve 600 nm civarındaki sarı-kırmızı emisyon bandları ile spektral pozisyonlar bağıl şiddetleri sayesinde mikroçevrelerinde olan olaylara karşı son derece hassastırlar. Bu değişimler atomik mesafelerde gerçekleştiğinden dolayı bu problemlerin konumlarının belirlenmesi ve oryantasyonlarının gerçekleşmediği durumlarda mutlak bir hassasiyet beklenemez. İki band gösteren 3-HF problemleri hücre içine yollandıklarında bulundukları konuma bağlı olarak onları tanımlayan bir çok parametreler belirlenmiştir. Buna benzer olarak polarite duyarlı boyalardaki iki emisyon bandındaki kaymalar da ortamın pH'ı ile doğrudan ilişkilidir.

Emisyon bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir.

Bu nedenle 3-Hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların bazı türevleri, daha avantajlı fluoresans özelliklerinden dolayı misellerde, model membranlarda ve protein moleküllerinde kullanılmaya elverişlidir.

3-Hidroksiflavon ve 3-hidroksikromon türevlerinin daha geniş alanlarda uygulanması bazı problemler nedeniyle kısıtlanmıştır. Bu problemlerden biri, maksimum absorpsiyon dalga boyunun, kısa dalga boylarında olması ve düşük kuantum verimidir. Daha uzun absorpsiyon maksimum dalga boyu elde etmek ve kuantum verimini arttırmak için 3-hidroksiflavonun 2-fenil grubuna benzo ve naftofuril gruplar yerleştirilmiştir.[29,30]

Diğer bir problem ise ESIPT reaksiyonundaki iki emisyon bandı arasındaki ışık şiddetleri oranının istenen aralıklarda olmamasıydı. 3- Hidroksiflavonlarda elektron donör 4-dialkilamino grubun varlığı I_N^* / I_T^* ışık şiddeti oranını önemli ölçüde arttırmıştır. 3-Hidroksiflavon ailesinin protik çözücülerde hidrojen bağı yapması çok önemli bir özelliktir.

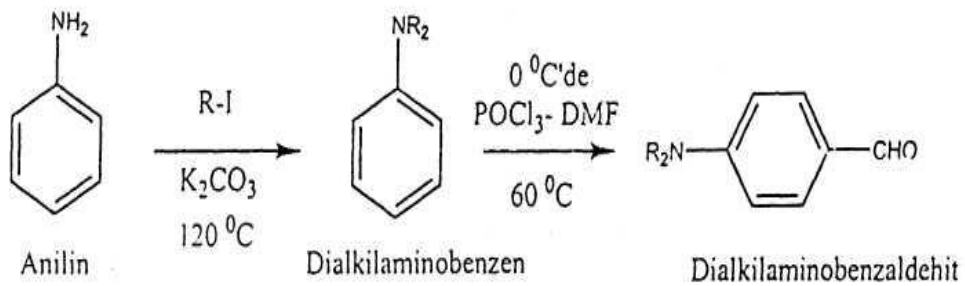
2.10.2. Prob- Çözücü Etkileşimleri

Özellikle aromatik halkalarında polar sübstitüentler içeren çok sayıda floroforun emisyon spektrumunun, çözücülerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine duyarlı olduğu bilinmektedir.[31] Floresans spektruma çözücü etkileri, genel ve spesifik çözücü etkileri olmak üzere ikiye ayrılır. Genel çözücü etkileri ile kastedilen etkiler, kırınım indeksi (n) ve dielektrik sabitten (s) kaynaklanır. Bu fiziksel sabitler çözücü moleküllerindeki elektronların hareket serbestliği ve bu moleküllerin dipol momentini işaret etmektedir. Spesifik çözücü etkileri, kompleksleşme ve hidrojen bağı gibi florofor ve çözücü molekülleri arasındaki spesifik kimyasal etkileşimleri gösterir. Hem genel hem de spesifik çözücü etkileşimleri önemli spektral kaymalara neden olabilir. Bu etkilerin iki kateoriye ayrılması spektral kaymaların farklı orjinleri nedeniyledir. Genel çözücü etkilerinin oluşması her zaman beklenen bir durumdur. Buna karşılık spesifik çözücü etkileri çözücü ve floroforun özel kimyasal yapılarına bağlı olacaktır.

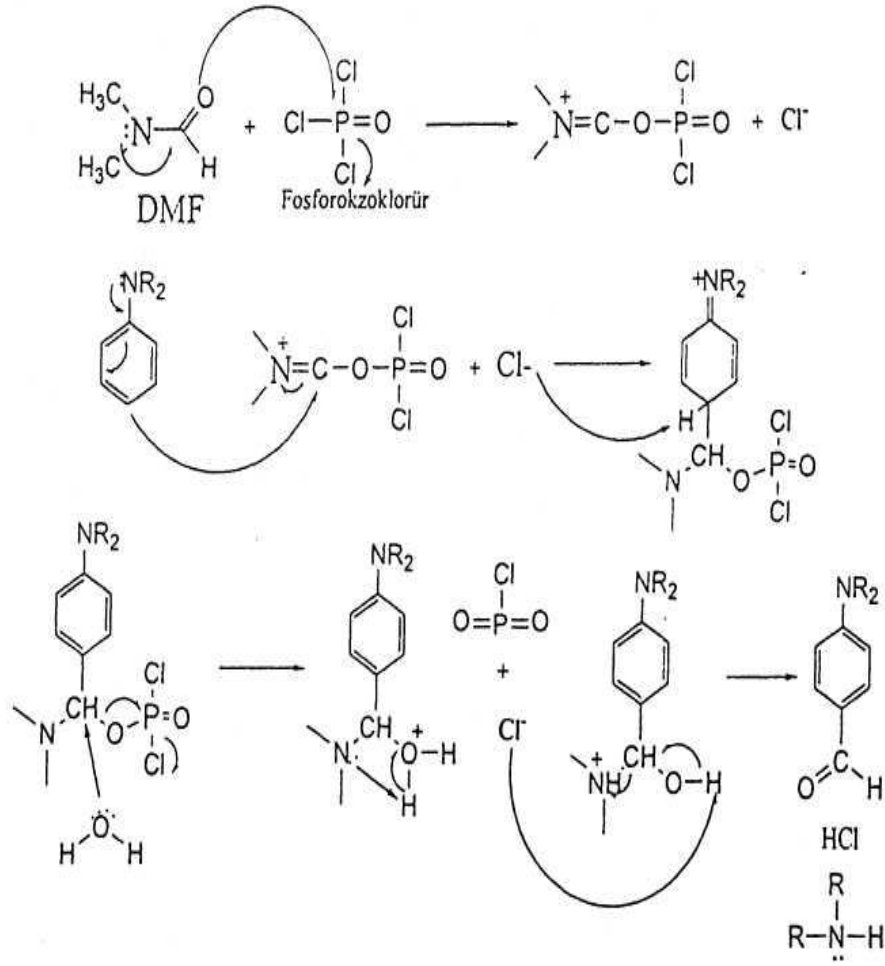
2.11. 3-Hidroksi Flavonların Sentez Yöntemleri

2.11.1. Algar-Flyn-Oyaamada reaksiyonu ile 3-hidroksiflavon sentezi

2-hidroksiasetofenon ve benzaldehit bileşiklerinin kondenzasyonu ile gerçekleştirilen bu sentez yönteminde; tasarlanan probun dizaynında 3-hidroksiflavonların, floresans spektrumunda konjugasyonu arttırarak kırmızı alana kayması, ve alkil grubunun farklı uzunluklarda olması ile de probun membranda çözünürlüğünü arttırmak için, elektron verici grup olarak benzaldehidin para pozisyonuna dialkilamino grupları farklı uzunluklarda takılarak 3-hidroksiflavon türevleri sentezlenmiştir.[30]



Şekil 2.34: Anilin Üzerinden Dialkilamino benzaldehit Bileşiğinin Sentezlenmesi

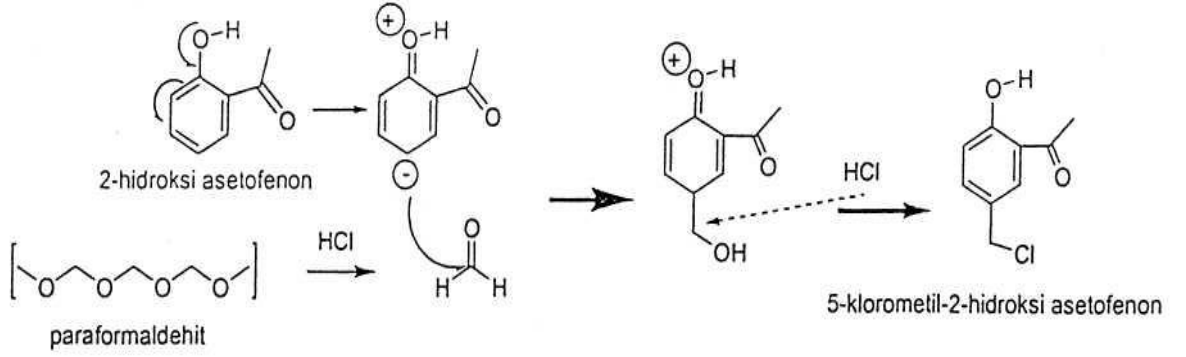


Şekil 2.35: (Vilsmeier Formylation) dialkilaminobenzene aldehit substitüentinin eklenmesi

Flavonun A halkasından çeşitli gruplara konjugasyonu düşünülerek bu amaçla klorometil grubu flavonun 6 pozisyonuna eklenmiştir. Bunun için de 2-hidroksi asetofenon bileşiğine 5 pozisyonunda klorometil grubu takılması düşünülmüştür. Moleküldeki hidroksi grubunun para yönlendirici ve ayrıca asetoksi grubunun da meta yönlendirici olmasından dolayı (Şekil 9) 2-hidroksiasetofenonun asidik ortamda paraformaldehit ile tepkimesi sonucu C-5 pozisyonuna klorometil grubu takıldı.

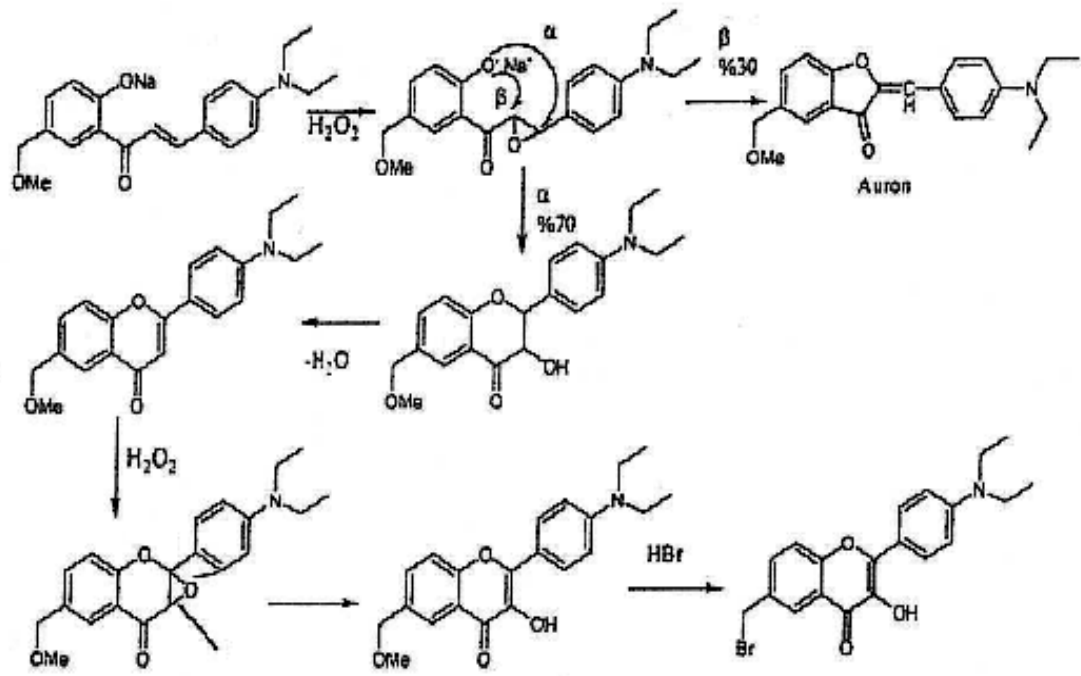
Burada asıl istenen formaldehit kullanılarak bu tepkimenin yapılmasıdır. Fakat formaldehit erime noktası -19 °C olduğu için normal şartlarda gaz halinde bulunan bir bileşik olup, bileşiğin ticari sunum şekli ya suda çözünmüş halde ya da katı halde polimer şeklinde uzun zincirli olmaktadır.

Organik kimyada sulu ortam pek istenmediğinden burada polimer halindeki adıyla paraformaldehit bileşiği satın alınarak derişik HCl ile zincirlerinin kırılması ve 2-hidroksi asetofenon' a C5 pozisyonunda bağlanması sağlanmıştır (Şekil 2.36).[32]



Şekil 2.36: 5-klorometil-2-hidroksi asetofenon bileşiği

5-klorometil-2-hidroksi asetofenon bileşiğinde en asidik proton olan asetildeki metil protonlarından biri bazik ortamda koparılarak bileşiğin bu kısımdan negatif yüklü hale geçmesiyle, alkilamino grubu takılı benzaldehit bileşiğinin karboniline saldırı gerçekleştirir. Böylelikle kalkon bileşiği meydana getirilir. Bu esnada C6 pozisyonundaki klorometil sübstitüenti de yerini metoksimetile bırakır. Kalkondaki çifte bağ H₂O₂ etkisi ile epoksite dönüştürülür ve NaOMe'in aşırısı kullanılarak oluşan bileşiğin 2 pozisyonundaki hidroksil grubu Na tuzu haline dönerek bu bağa a ve P yönünde saldırır ve halka kapaması meydana getirir.[17,18] Sonuç ürün flavonol ve auron olmak üzere sırasıyla %70 ve %30 oranında elde edilir (şekil 2.37)



Şekil 2.37: Kalkondan 3-Hidroksi Flavon Eldesi

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Genel Teknikler

3.1.1. Kromatografi

3.1.1.1. Kolon Kromatografisi

Bitki ekstralarının ve sentez ürünlerinin fraksiyonlandırılarak ayrılması amacı ile kullanıldı. Adsorban olarak Merck firmasının, Kieselgel 100 (0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) alındı. Adsorban, dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş cam sütunlara konuldu, hafifçe vurularak yerleştirildi ve üst kısmına paketlenme yoluyla yani adsorbanla karıştırılmış ve çözücüsü tamamen uçurulmuş ekstre ilave edildi. Ayrıca çözelti geçirilmiş adsorban üzerine aynı çözücü içinde çözülmüş ekstre de ilave edilerek çalışılabilir. Ekstrelerin miktarına bağlı olarak farklı ebatlarda sütunlar kullanılmıştır.

3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi

35 g silikagel G (Kiesel G, E. Merck. Typ 60) adsorbanın 70 mL distile su ile çalkalanıp CAMAG plak kaplama aletiyle 20 x 20 cm boyutlarındaki cam plakların 0.5 mm kalınlıkta kaplanması ve oda ısısında kurutulup 105°C'de 1 saat aktive edilmesiyle hazırlanan plaklar preparatif amaçla kullanıldı. İnce tabakalar ve diğer preparatif çalışmalar için (G.Merck 5554) hazır plaklardan yararlanıldı.

3.1.2. Spektrometreler

2.1.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrofotometresi

Spektrumlar Shimadzu 1601 cihazında 1 cm'lik kuvars küvetlerde alındı. Ölçümler bileşiklerin farklı çözeltilerinde yapıldı.

3.1.2.2. İnfrared (IR) Spektrofotometresi

IR Spektrumları 'Perkin Elmer 1615 ' cihazında alındı. Katı bileşikler KBr ile pellet hazırlanarak spektral analizleri yapıldı.

2.1.2.3. ¹H NMR ve ¹³C NMR Spektrometresi

Ürünlerin ¹H-NMR spektrumları CDCl₃ de, İ.T.Ü. de Bruker AC 250 model cihazda kaydedilmiştir. Kimyasal kaymalar TMS iç standarda göre δ (ppm) cinsinden, etkileşme sabitleri (J) ise Hz cinsinden verilmiştir

2.1.2.4. Floresans Spektrofotometresi

Probların çözücüler içindeki floresans spektrumları Quanta Master (PTI) spektrometresi ile alınırken, membran çalışmaları sırasında veziküller içindeki spektrumları da SLM 48000 (SLM-Aminco) spektrometresi ile alınmıştır

3.1.3. Çözücüler ve Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ekstraksiyon işlemlerinde ve sütunda ön ayırma işlemlerinde teknik çözücüler distile edildikten sonra kullanılmış, madde saflaştırılmasında Merck çözücüler ve spektral analizler için spektroskopik çözücüler kullanılmıştır.

Derişik HCl (Filika), 2-hidroksi asetofenon (Aldrich), p-formaldehit (Aldrich), sodyum hidroksit (Sigma), 4'-N,N-dietilamino-2-hidroksikalkon (Aldrich), H₂O₂ (%30'luk) Fluka, HBr (%63'lük) Aldrich, sodyum karbonat (Sigma), DMF (Acros), sodyum hidrür (Aldrich). metanol (Merck), hekzan (Merck), diklorometan (Merck), asetonitril (Merck), kloroform (Merck), etil asetat (Merck).

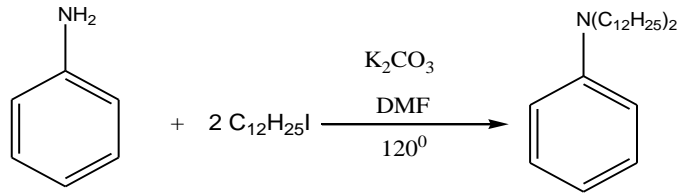
3.1.4. Kullanılan Elektronik Aygıtlar

Ultraviyole Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Infrared Spektrofotometre	Perkin Elmer Model 1600
Nükleer Magnetik Rezonans Spektrometre	(R) Varian Mercury-Vx 400 ve Jeol 500 MHz
Floresas Spektrofotometresi	Büchi512

3.2. Sentez Bileşikleri

3.2.1. FN12 Sentezi İçin Genel Prosedür

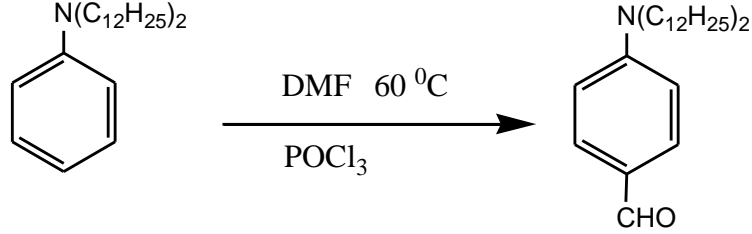
3.2.1.1. N,N-didodesilbenzamin Sentezi İçin Genel Prosedür



Bir balon içerisindeki 0,1 mol anilin 15 mL kuru DMF içinde önceden 120⁰'ye getirilmiş yağ banyosunda karışmaya bırakılır. Ardından 0,11 mol K₂CO₃ ilave edilip, 0,2 mol didodesiliyodat da eklenip 6-12 saat karışmaya bırakılır. Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilir. Sonuç ürün CH₂Cl₂ ile ekstrakte edilir ve Na₂SO₄ ile kurutulur. Daha fazla saflandırma yapılmadan bir sonraki reaksiyona geçilir.

3.2.1.2. 4-(didodesilamino)benzaldehit Sentezi İçin Genel Prosedür

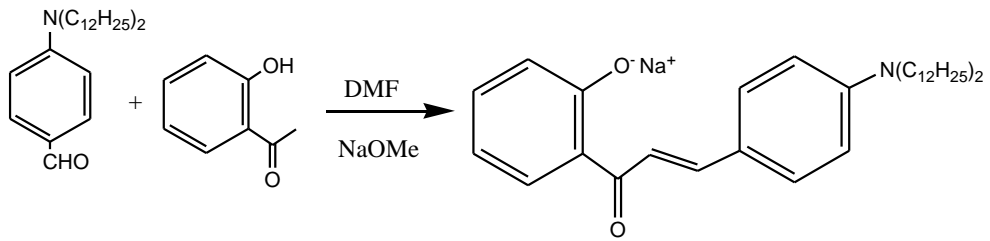
(Vilsmeier Formulation)



0,07 mol POCl₃ buz banyosunda olan 0,3 mL DMF içine yavaş yavaş ilave edilir, yoğun sarı renkli gaz çıkışından dolayı CaCl₂ tüpü kullanılır. Gaz çıkışı sona erdikten sonra karışıma 0,04 mol didodesilaminobenzen ilave edilir ve 6-8 saat süre ile 60⁰ de karışmaya bırakılır. Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilir. Daha fazla saflandırma yapılmadan bir sonraki reaksiyona geçilir.

3.2.1.3. Kalkon Sentezi İçin Genel Prosedür

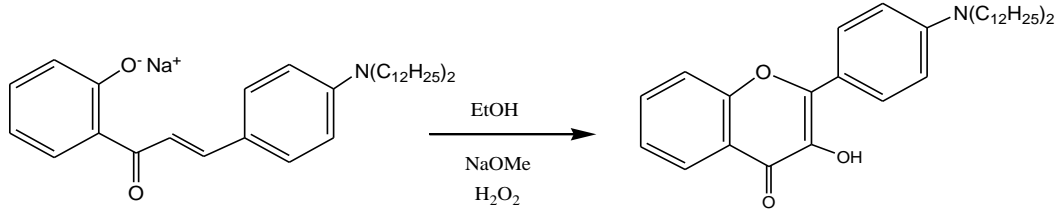
(Algar-Flyn-Oyaamada Reaksiyonları)



1 ekivalen didodesilaminobenzaldehyt ve 1 ekivalen 2-hidroksiasetofenon yeterli miktarda DMF içerisinde çözülür. Ardından 4 ekivalen NaOMe ilave edilir ve de kırmızı renkli kalkon oluşana kadar karışmaya bırakılır. Zincir moleküle yağsı özellik kazandırdığından reaksiyon gerçekleşme süresi 12-24 saat sürebilir. Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilir.

3.2.1.4. 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-one

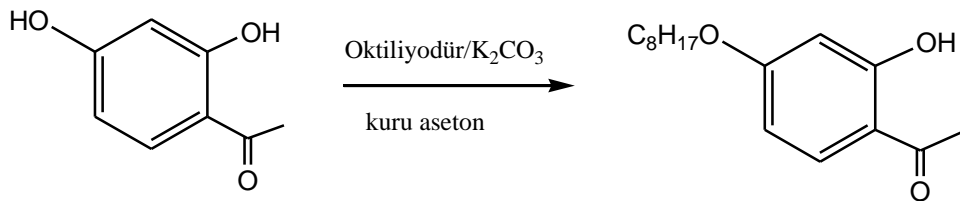
(Flavon) Sentezi için Genel Prosedür (Halka Kapanması)



Kırmızı renkli kalkona önceden kullanılan DMF miktarının 3-5 (1,38-2,3ml) katı kadar EtOH ilave edilir. 1 equivalent aldehite karşılık 14 equivalent NaOMe ilave edilir. Herhangi bir ısınma gerçekleştiği takdirde balon soğutulur. Bu işlemin ardından 12 ekivalen H₂O₂ karışıma ilave edilir, ve de önceden 120⁰'ye ayarlanmış yağ banyosunda köpürme gerçekleşinceye kadar geri soğutuculu düzenekle karışmaya bırakılır. Elde edilen sarı renkli flavon 50-100 mL su içerisine dökülerek asetik asit ile nötralizasyon gerçekleştirilir. Bu işlemin ardından CH₂Cl₂ ile ekstraksiyon, Na₂SO₄ ile kurutma yapılır. Solvent rotary de uzaklaştırılıp ham ürün %30 etilasetat %70 hekzan solvent sisteminde, kolon kromatografisi ile saflandırılır.

3.2.2. OFN Sentezi İçin Genel Prosedür

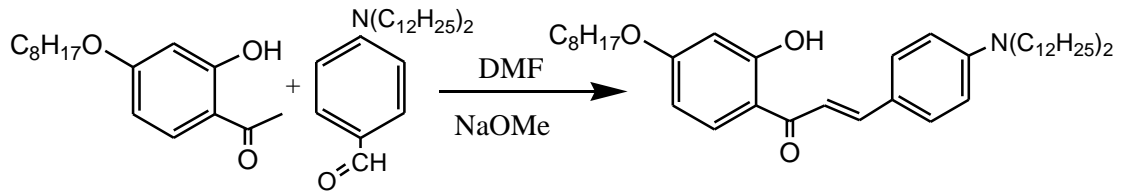
3.2.2.1. 2-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Sentezi İçin Genel Prosedür



1 mol 2,4-dihidroksiasetofenon , 1 mol oktiliyodür ve de 1,1 mol K₂CO₃ üç saat boyunca aseton içerisinde geri soğutuculu düzenekte karışmaya bırakılır. Reaksiyonun ilerleyişi reaksiyon karışımından alınan bir miktar maddenin önce suda

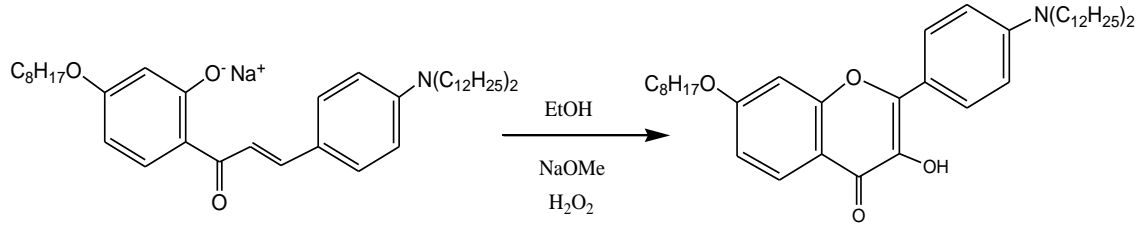
      , n  tralize edilip ardından da mini-ekstraksiyon yapılmasından sonra gerçekleştirilecek ince tabaka kromatografisi ile takip edilir. Aksi takdirde dihidroksiasetofenon tuzu şeklinde olacağından ince tabaka kromatografisinde g  zlenmeyecektir. Reaksiyon karışımı soğutulduktan sonra su ilave edilir. Ardından da etilasetat ile ekstraksiyon gerçekleştirilir. Ekstraksiyonun ardından Na₂SO₄ ile kurutma gerçekleştirilir. Ardından        rotaride uçurularak kolon kromatografisi ile saflaştırma gerçekleştirilir. Bu reaksiyon içindeki en önemli noktalardan biri ortamın bazikliğinin korunmasıdır. Hafif bazik bir pH başlangıç maddesi olan 2,4-dihidroksiasetofenonun su içerisinde kalmasını sağlayacaktır.

3.2.2.1. Kalkon Sentezi İçin Genel Prosedür



1 ekivalen didodesilaminobenzaldehit ve 1 ekivalen 2-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon yeterli miktarda DMF içerisinde      r. Ardından 4 ekivalen NaOMe ilave edilir ve de kırmızı renkli kalkon olu ana kadar karı maya bırakılır. Zincir moleküle yağsı özellik kazandırdığından reaksiyon gerçekleşme süresi 12-24 saat sürebilir. Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilir.

3.2.2.3. 2-(4-(Didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-7-(oktiloksi)-4H-kromen-4-one (Flavon) Sentezi İçin Genel Prosedür

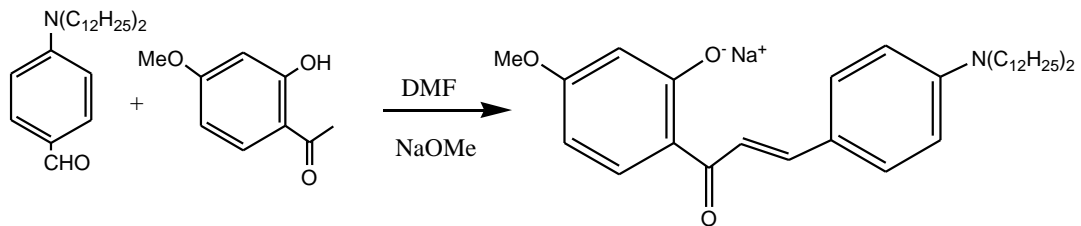


Kırmızı renkli kalkona önceden kullanılan DMF miktarının 3-5 (1,38-2,3ml) katı kadar EtOH ilave edilir. 1 ekivalen aldehite karşılık 14 ekivalen NaOMe ilave edilir. Herhangi bir ısınma gerçekleştiği takdirde balon soğutulur. Bu işlemin ardından 12 equivalent H₂O₂ karışıma ilave edilir, ve de önceden 120⁰'ye ayarlanmış yağ banyosunda köpürme gerçekleşinceye kadar geri soğutuculu düzenekle karışmaya bırakılır. Elde edilen sarı renkli flavon 50-100 mL su içerisine dökülerek asetik asit ile nötralizasyon gerçekleştirilir. Bu işlemin ardından CH₂Cl₂ ile ekstraksiyon, Na₂SO₄ ile kurutma yapılır. Çözücü rotaevaporatör de uzaklaştırılıp ham ürün %30 etilasetat %70 hegzan solvent sisteminde, kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

3.2.3. MFN12 Sentezi İçin Genel Prosedür

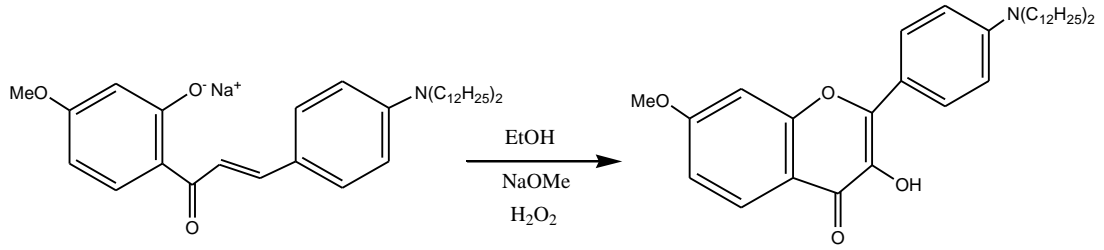
3.2.3.1. 1-(2-Hidroksi-4-metoksifenil)etanon Üzerinden

Kalkon Sentezi İçin Genel Prosedür



1 ekivalen didodesilaminobenzaldehyt ve 1 ekivalen 1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)etanon yeterli miktarda DMF içerisinde çözülür. Ardından 4 ekivalen NaOMe ilave edilir ve de kırmızı renkli kalkon oluşana kadar karışmaya bırakılır. Zincir moleküle yağsı özellik kazandırdığından reaksiyon gerçekleşme süresi 12-24 saat sürebilir. Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile takip edilir.

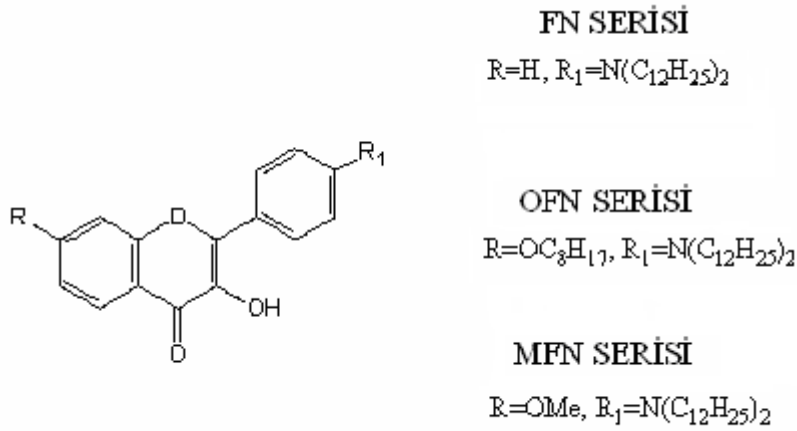
3.2.3.2. 2-(4-(didodecylamino)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-4H-chromen-4-one (Flavon) Sentezi



Kırmızı renkli kalkona önceden kullanılan DMF miktarının 3-5 (1,38-2,3ml) katı kadar EtOH ilave edilir. 1 ekivalen aldehite karşılık 14 ekivalen NaOMe ilave edilir. Herhangi bir ısınma gerçekleştiği takdirde balon soğutulur. Bu işlemin ardından 12 ekivalen H₂O₂ karışıma ilave edilir, ve de önceden 120⁰'ye ayarlanmış yağ banyosunda köpürme gerçekleşinceye kadar geri soğutuculu düzenekle karışmaya bırakılır. Elde edilen sarı renkli flavon 50-100 mL su içerisine dökülerek asetik asit ile nötralizasyon gerçekleştirilir. Bu işlemin ardından CH₂Cl₂ ile ekstraksiyon, Na₂SO₄ ile kurutma yapılır. Çözücü rotary de uzaklaştırılıp ham ürün %30 etilasetat %70 hegzan solvent sisteminde, kolon kromatografisi ile saflaştırılır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

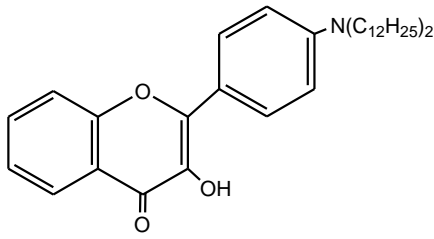
3 hidroksi flavon türevleri mikro çevrelerinde meydana gelen ufak değişimlere karşı çok hassas olduklarından ve de bu değişimlere birbirlerinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt verdiklerinden dolayı oldukça popüler floresans sensörleridir. 3-hidroksiflavonların tasarlanan problemlerinin dizaynında, floresans spektrumunda konjugasyonunun artırılarak kırmızı alana kaymasını sağlamak ve alkil grubunun farklı uzunluklarda olması ile de probun membranda çözünürlüğünü artırmak için, elektron verici grup olarak benzaldehidin para pozisyonuna dialkilamino grupları farklı uzunluklarda takılmıştır. 3-hidroksiflavon'un yağsı özelliğinin artırılarak non-polar özelliği artacak olan sensörler sentez edilmiştir.



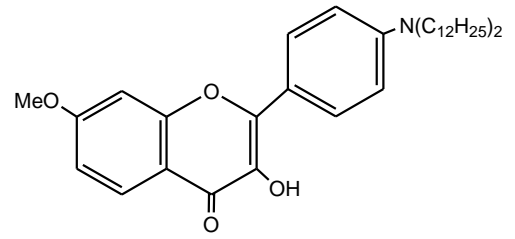
Şekil 4.1: Sentezlenen Problemler

Bu çalışmada şekil 4.1.'de görüldüğü gibi, grubumuzca membran çalışmalarında floresans sensör olarak kullanılmak üzere 3-hidroksiflavon probunun sentezi ve probda benzaldehidin para pozisyonuna didodesilamino grubu takılarak FN12 (Şekil 4.2) sentezi gerçekleştirildi.

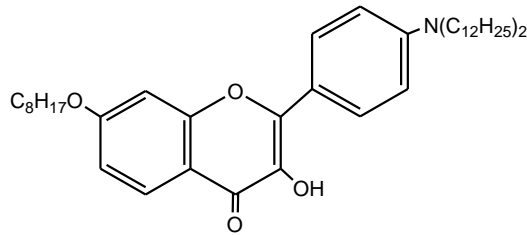
Yine R pozisyonuna metoksi grubu takılarak MFN12 (şekil 4.3) sentezi; R pozisyonuna oktiloksi grubu eklenerek de OFN12 (şekil 4.4) sentezi gerçekleştirildi. Böylece non-polar özelliğinin artırılması ve membranda çözünürlüğünün sağlanması amaçlanan floresans sensörler sentez edilmiştir.



Şekil 4.2. FN12 Probu



Şekil 4.3. MFN12 Probu

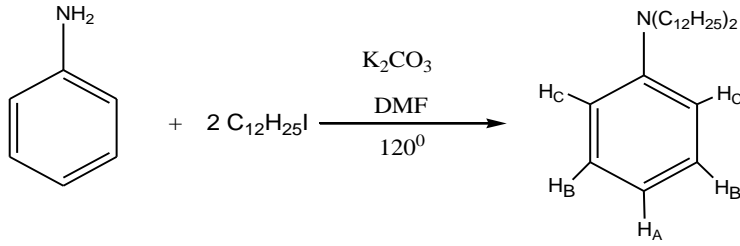


Şekil 4.4. OFN12 Probu

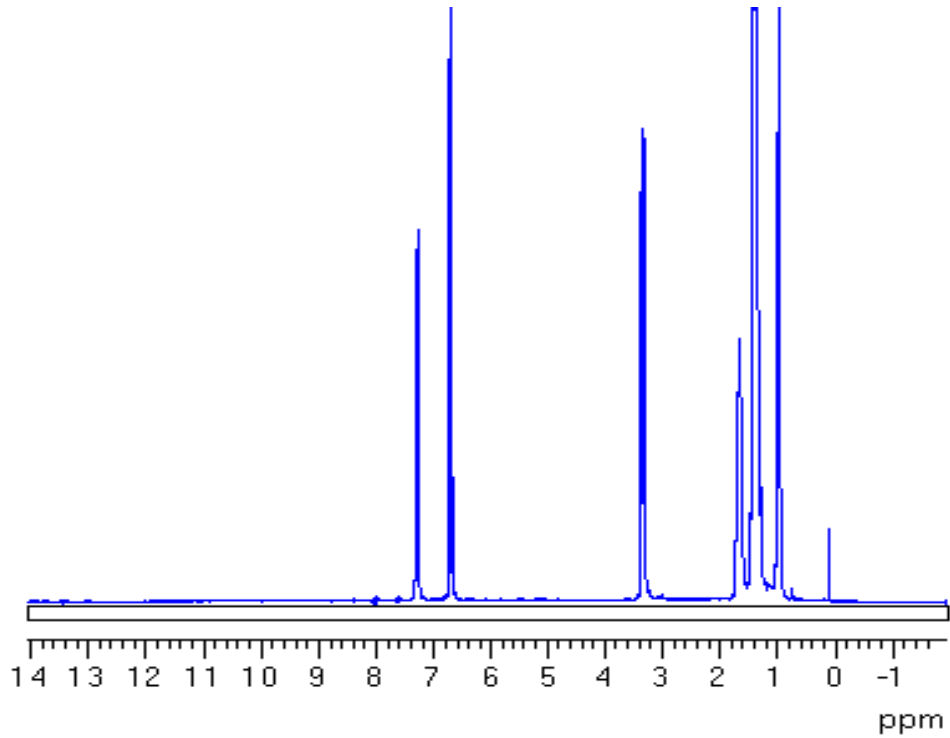
4.1. Sentez Bileşikleri

4.1.1. FN12 Serisi

4.1.1.1. N,N-Didodesilbenzamin Sentezi

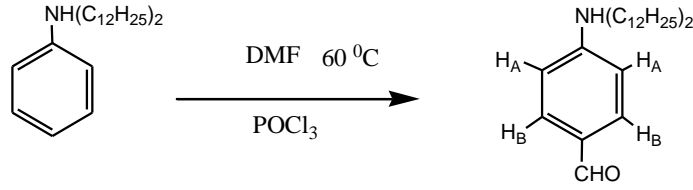


Bölüm 3 de verilen yönteme göre sentezlenmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.5) azota bağlı karbondaki protonlar için 3.35 ppm’de (triplet), en uçtaki protonlar için yaklaşık 0.9 ppm’de triplet ve aradaki protonlar için yaklaşık 1.3 ppm’de multipletler görülmektedir. Aromatik halkada H_A , H_C protonları 6.6. ppm de kompleks H_B protonları da 7.1 ppm civarında kompleks pikler vermektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını (55) doğrulamaktadır.

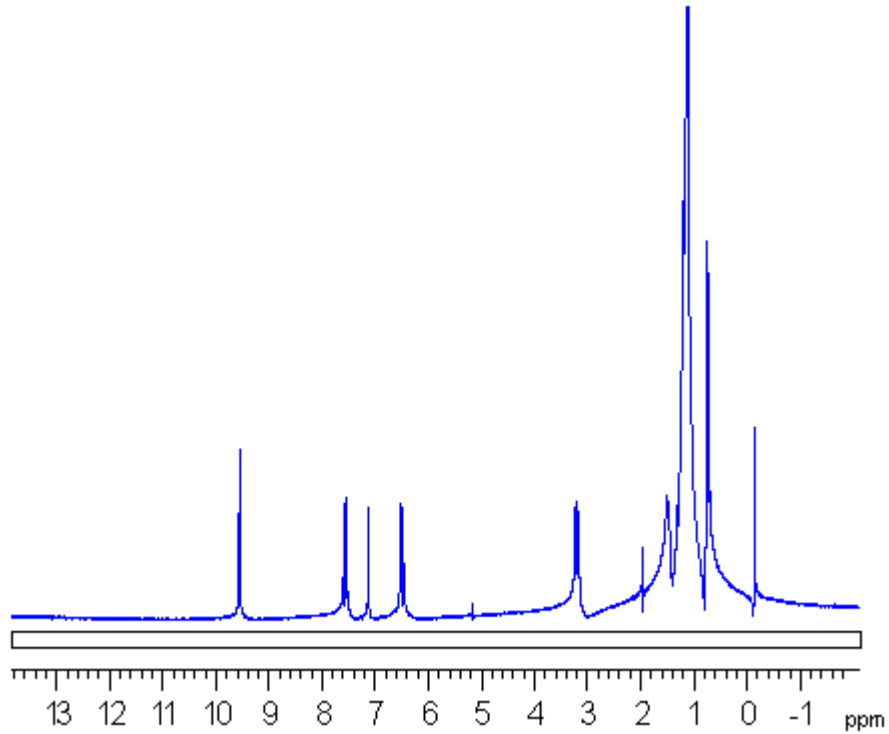


Şekil 4.5: N,N-didodesilbenzamin ^1H -NMR spektrumu

4.1.1.2.-(Didodesilamino)benzaldehit Sentezi

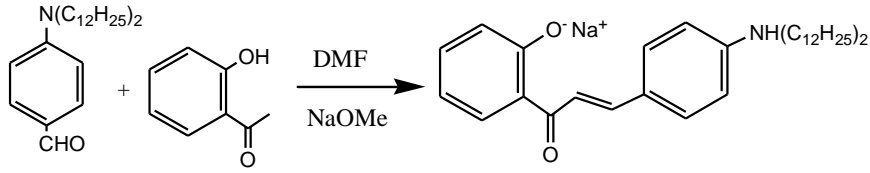


Bölüm 3 de verilen yöntemle göre sentezlenmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.6) azota bağlı karbondaki protonlar için 3.35 ppm'de (triplet), en uçtaki protonlar için yaklaşık 0.9 ppm'de triplet ve aradaki protonlar için yaklaşık 1.3 ppm'de multipletler görülmektedir. H_A protonları 6.7 ppm de dublet ($J_{\text{AB}} = 9.1 \text{ Hz}$), H_B protonları 7.7 ppm'de dublet ($J_{\text{BA}} = 9.1 \text{ Hz}$) vermektedir. Karbonil $-\text{CHO}$ protonuna ait pik 9.8 ppm'de (singlet) görülmektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını (55) doğrulamaktadır.



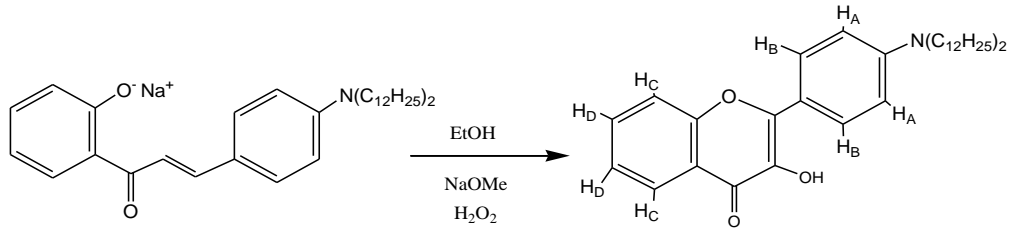
Şekil 4.6: 4-(didodesilamino)benzaldehit ^1H -NMR spektrumu

4.1.1.3. Kalkon Sentezi

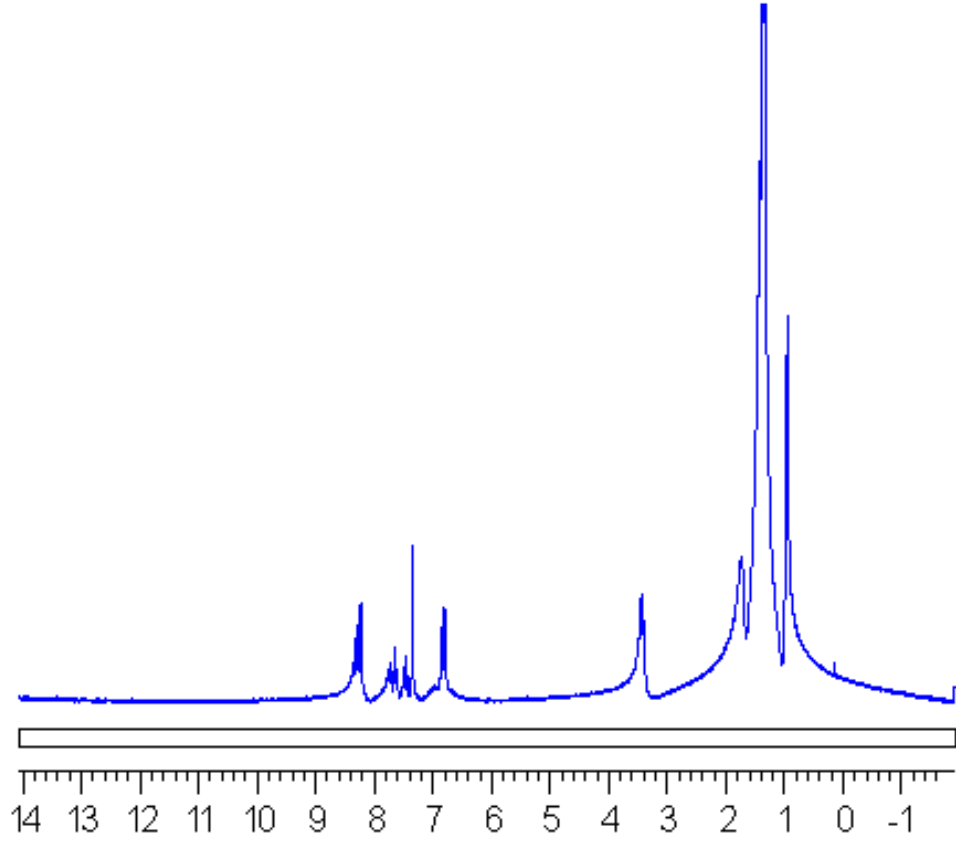


4.1.1.4. 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-one

(Flavon) Sentezi



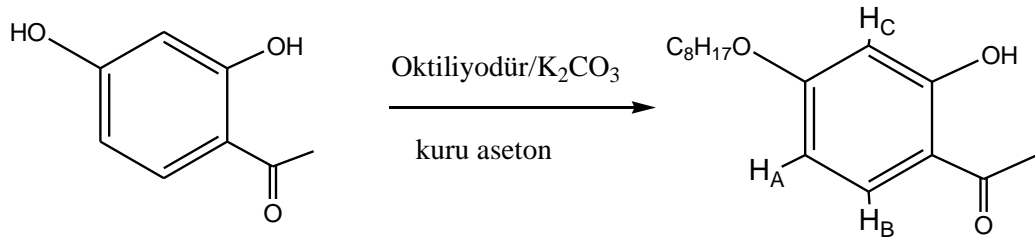
Bölüm 3 de verilen yöntemle göre elde edilmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.7) azota bağlı karbondaki protonlar için 3.35 ppm'de (triplet), en uçtaki protonlar için yaklaşık 0.9 ppm'de triplet ve aradaki protonlar için yaklaşık 1.3 ppm'de multiplerler görülmektedir. Aromatik halkada H_A protonları 6.7 ppm'de dublet ($J_{AB} = 9.4 \text{ Hz}$) H_B protonları 7.1 ppm'de dublet ($J_{BA} = 9.4 \text{ Hz}$), aromatik halkadaki H_C ve H_D protonları da 7.2 ppm ile 8.2 ppm aromatik bölgesinde kompleks pikler vermektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını desteklemektedir.



Şekil 4.7: FN12 ait ^1H -NMR spektrumu

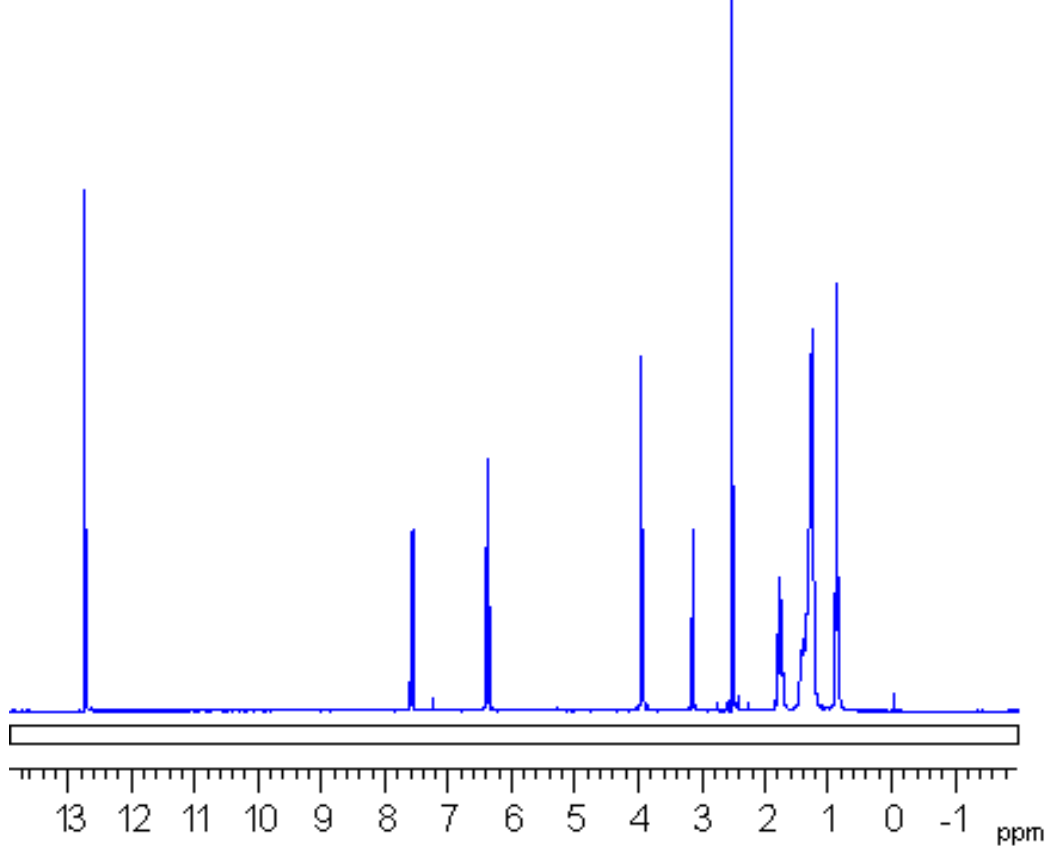
4.1.2. OFN12 Serisi

4.1.2.1-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Sentezi



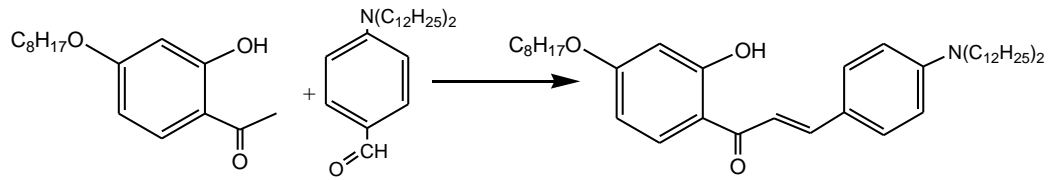
Bölüm III. de verilen yöntemle göre sentezlenmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.8) $-\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}$ grubunda oksijene komşu karbondaki protonlar için yaklaşık 3.9 ppm'de (triplet), en uçtaki protonlar için 0.9 ppm (triplet) ve aradaki protonlar için yaklaşık 1.3-1.5 ppm'de (multiplet) pikler görülmektedir. Asetile ait proton 2.55 ppm (singlet) vermektedir.

Aromatik halkaya ait protonlardan H_A 6.5 ppm’de dublet-dublet ($J_{AB} = 7.4 \text{ Hz}$, $J_{AC} = 2 \text{ Hz}$), H_B 7.6 ppm’de dublet ($J_{BA} = 7.4 \text{ Hz}$) HC 6.4 ppm’de pik vermektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını doğrulamaktadır.



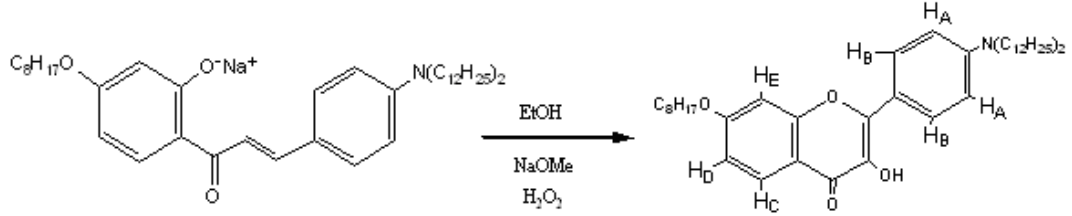
Şekil 4.8: 2-Hidroksi-4-oktiloksiasetofenon ^1H -NMR spektrumu

4.1.2.2. Kalkon Sentezi

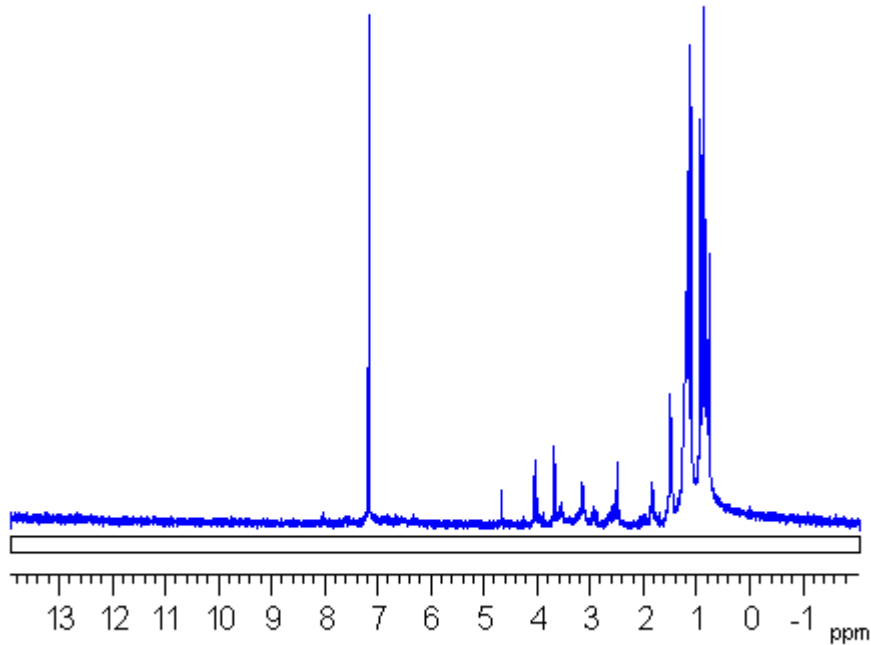


4.1.2.3 2-(4-(didodesilamino)fenil)-3-hidroksi-7-(oktiloksi)-4H-kromen-4-one

(Flavon) Sentezi



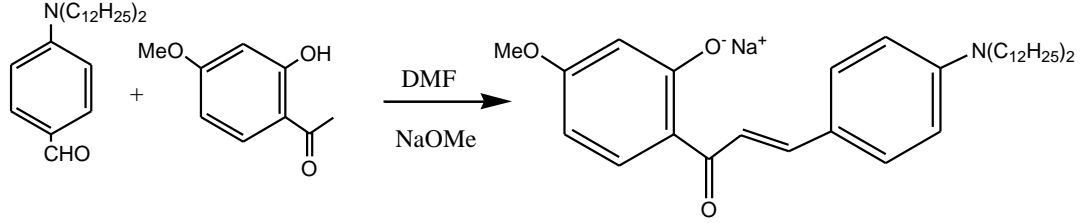
Bölüm 3’de verilen yöntemle sentezlenmiştir. Ürüne ait 1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.9) $-C_8H_{17}O$ grubunda oksijene komşu karbondaki protonlar için yaklaşık 3.9 ppm’de (triplet), en uçtaki protonlar için 0.9 ppm (triplet) ve aradaki protonlar için yaklaşık 1.3-1.5 ppm’de (multiplet) pikler görülmektedir. Aromatik halkada H_A protonları 6.7 ppm’de dublet-dublet ($J_{AB} = 9.4$ Hz) H_B protonları 7.1 ppm’de dublet-dublet ($J_{BA} = 9.4$ Hz), aromatik halkadaki H_C ve H_D protonları da 7 ppm ile 7.9 ppm aromatik bölgesinde kompleks pikler vermektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını desteklemektedir.



Şekil 4.9: OFN12 ait 1H -NMR spektrumu

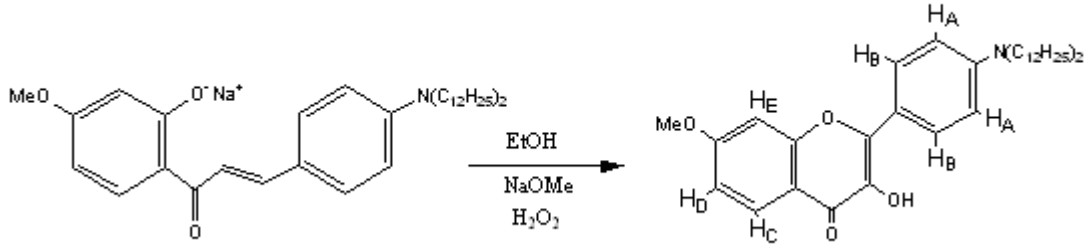
4.1.3. MFN12 SERİSİ

4.1.3.1. 1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)etanon Üzerinden kalkon sentezi

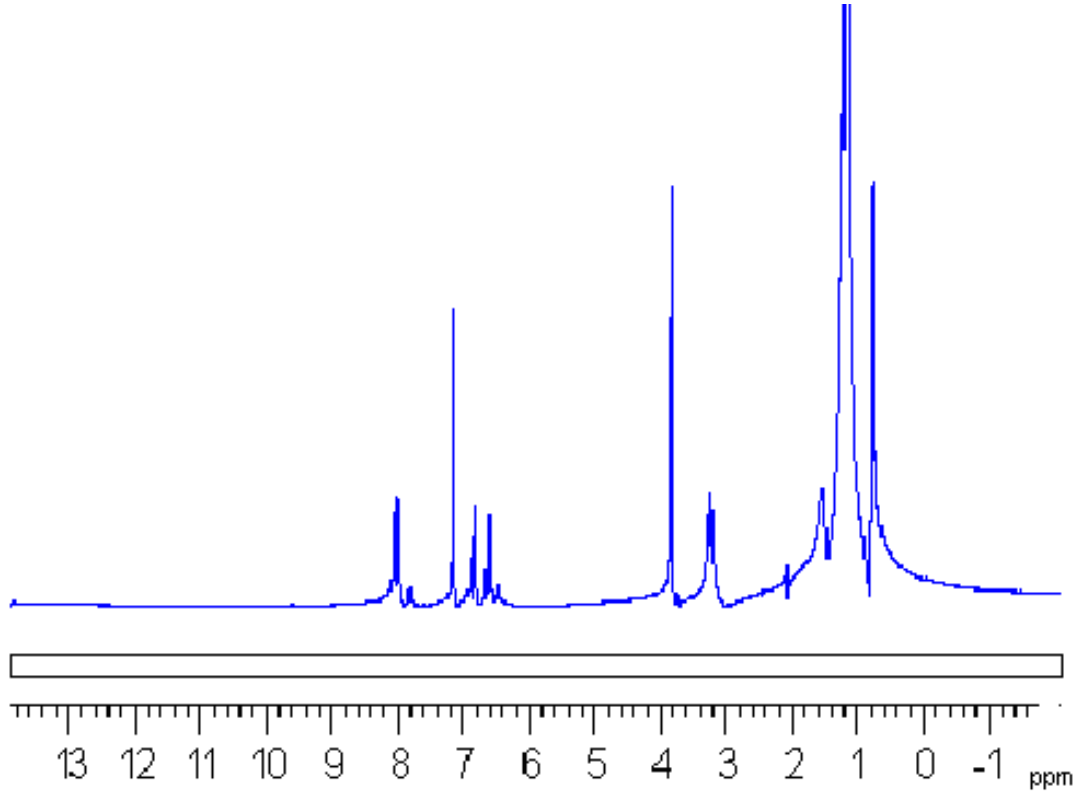


4.1.3.2. 2-(4-(didodesil)fenil)-3-hidroksi-7-metoksi-4H-kromen-4-one

(Flavon) Sentezi

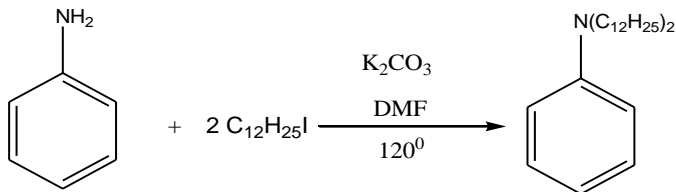
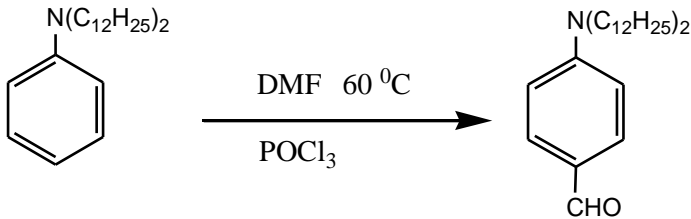
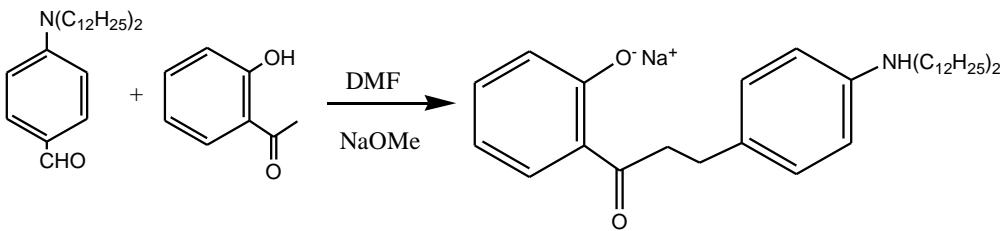


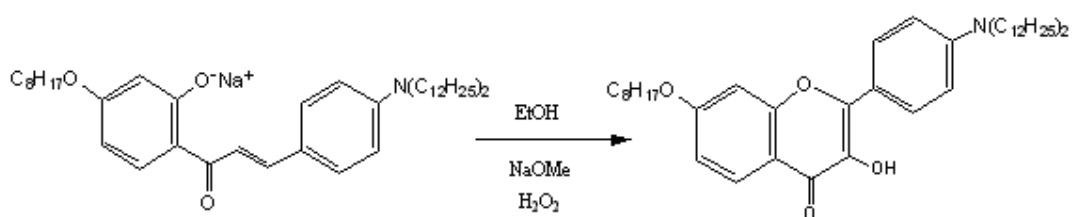
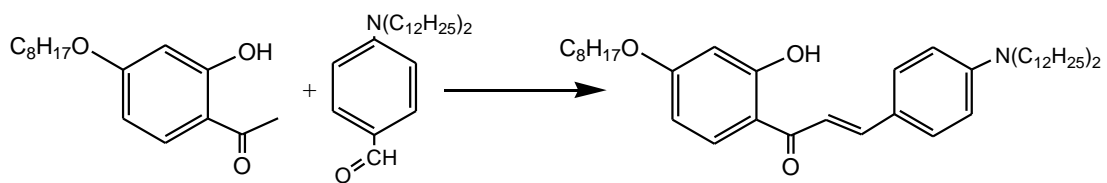
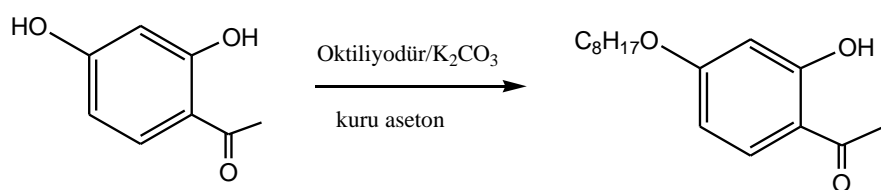
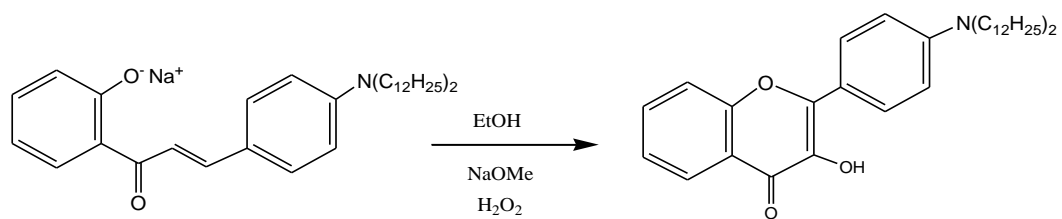
Bölüm 3 'de verilen yönteme göre sentezlenmiştir. Ürüne ait ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 4.10) metoksi grubu protonlarına ait pik 3.9 ppm'de singlet, aromatik halkada H_A protonları 6.7 ppm'de dublet ($J_{AB} = 9.4$ Hz) H_B protonları 7.1 ppm'de dublet ($J_{BA} = 9.4$ Hz), aromatik halkadaki H_C ve H_D protonları da 7 ppm ile 7.9 ppm aromatik bölgesinde kompleks pikler vermektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını desteklemektedir.

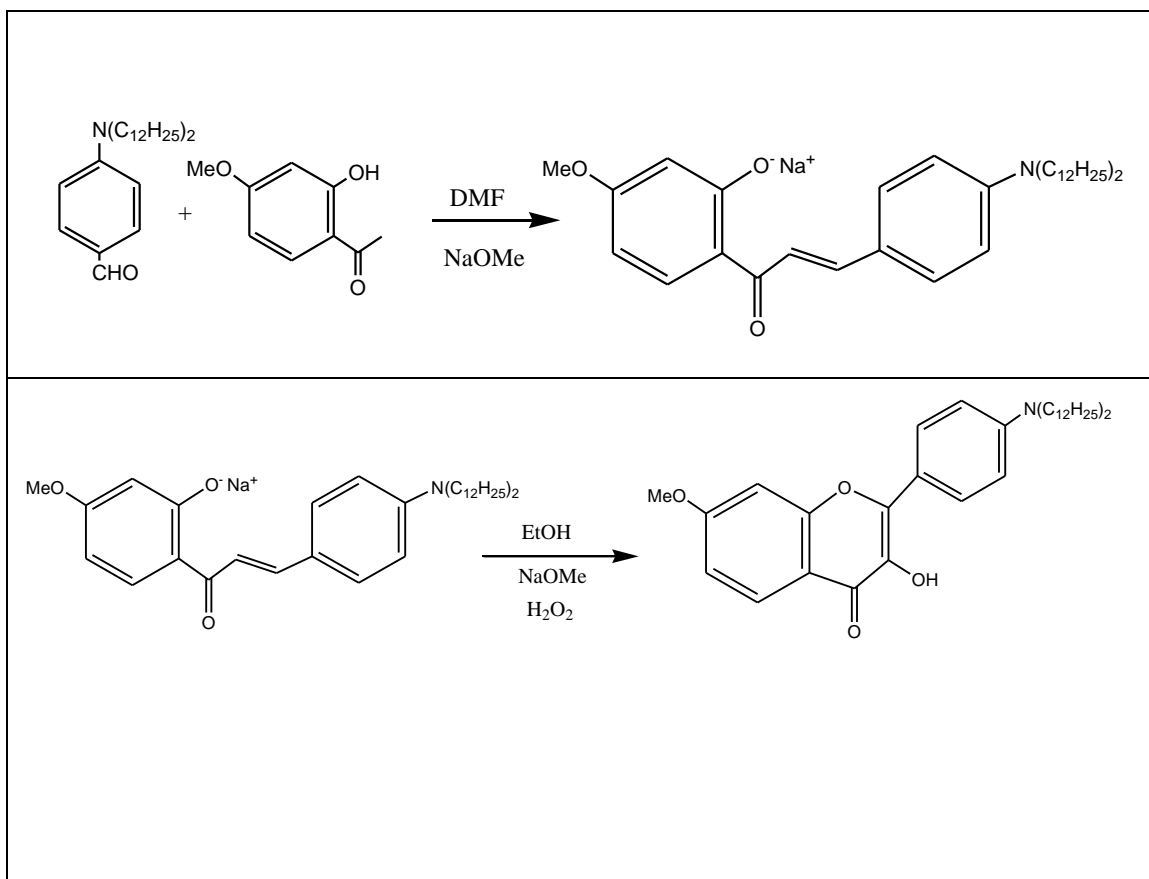


Şekil 4.10: MFN12'ye ait ^1H -NMR spektru

Tablo 4.1: Gerçekleştirilen Reaksiyonlar

Gerçekleştirilen Reaksiyonlar	
	
	
	





4.2. Sentezlenen Problara ait Floresans Ölçümleri

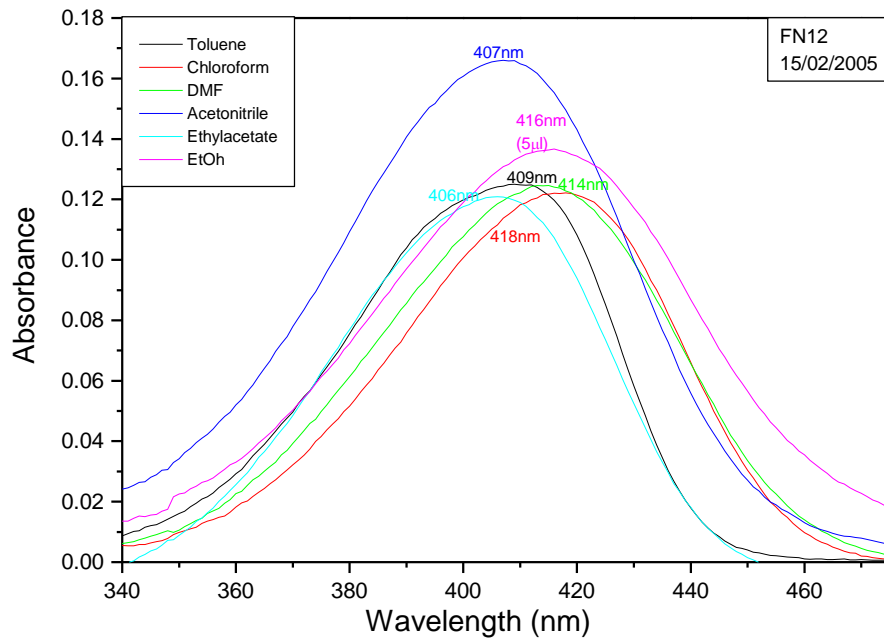
3-hidroksiflavyonlara ait olan, iki floresan pik verebilme özelliği, bu moleküllerin uyarılma durumunda (excited state), iç proton transferi (intramolecular proton transfer) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır.

3HF normal uyarılmış durum (N*) ve de photo-tautomer (T*) reaksiyon ürünü veren iki emisyon bandının uyarılmış durum intramoleküler proton transferi (ESIPT) yapma özelliği gösterir. İkinci bant çarpıcı bir şekilde yüksek dalga boyuna kayarak birbirinden ayrı iki tane emisyon yapan bant gözlenir. 3HF nin ESIPT reaksiyonu sonucu reaktan ve reaksiyon ürünü için iki farklı uyarılmış bölge yayını gözlenebilir. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant şeklindedir. Mavi bölgedeki bant normal uyarılmış durumdan (N*) kaynaklanır. Önemli ölçüde kırmızıya kayan diğer bant ise uyarılmış tautomer durumdan (T*) kaynaklanır. Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık gibi spektroskopik davranışlar 3-hidroksiflavyon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve onların mikro çevre

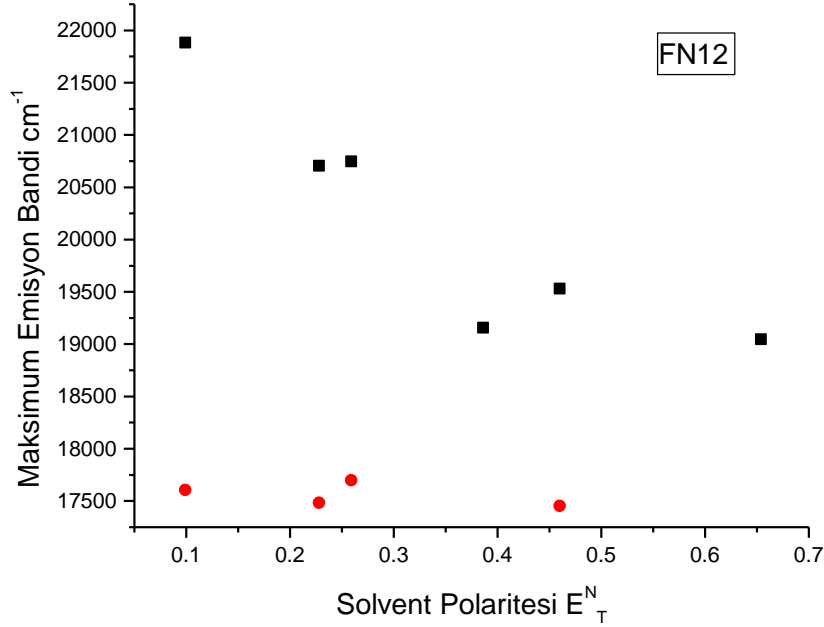
parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. 3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır. Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle floresans ölçümleri farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. FN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri

Floresans ölçümleri molekülün maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda ışığın molekül üzerine yollanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla molekülün önce maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu tespit edildi. Absorpsiyon ölçümleri sırasında farklı çözücü sistemleri kullanıldı. Beklenildiği gibi sentezlenen moleküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumlarında çözücüye bağlı kaymalar görüldü. Genellikle polaritenin artması ile floresans absorpsiyonunun ve emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kaymıştır.

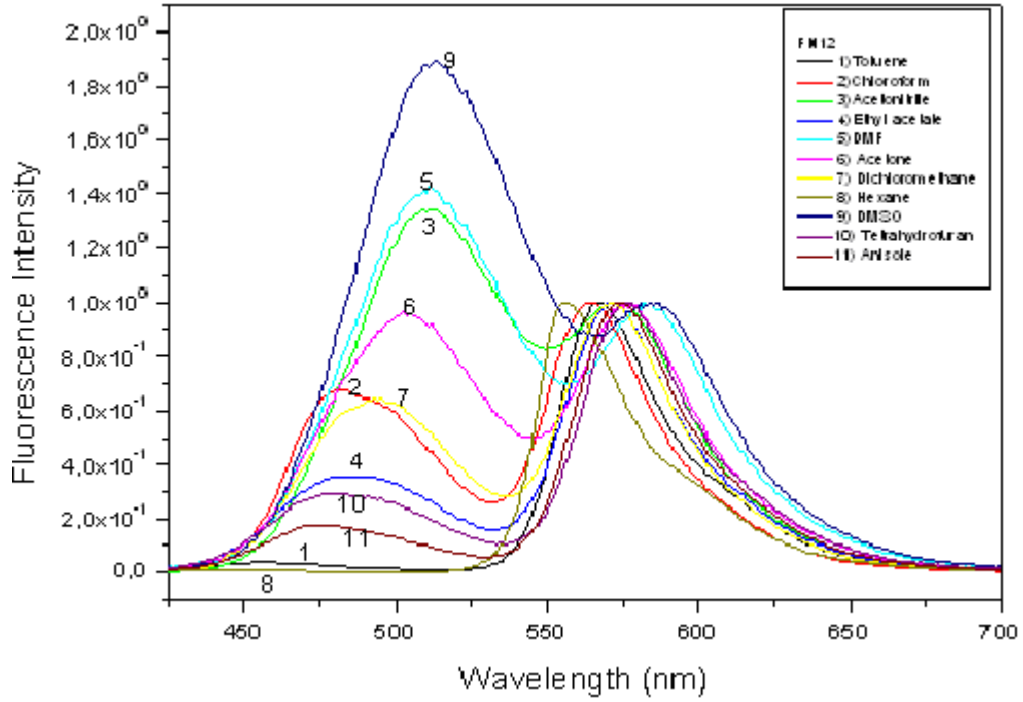


Şekil 4.2.1.1: Farklı çözücülerde FN12 probu için elde edilen maksimum absorbans



Şekil 4.2.1.2: Farklı çözücülerde FN12 Probu için elde edilen maksimum emisyon noktaları (Çözücüler: 1-hekzan, 2-toluen, 3-etilasetat, 4-kloroform, 6-aseton)

3HF nin ESIPT reaksiyonu sonucu reaktan ve reaksiyon ürünü için iki farklı uyarılmış bölge yayını gözlemlenebilir. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant şeklindedir. Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık, absorpsiyon ve floresans maksimumlarının pozisyonları, floresans kuantum verimleri gibi spektroskopik davranışlar, 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve onların mikro çevre parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. 3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır.

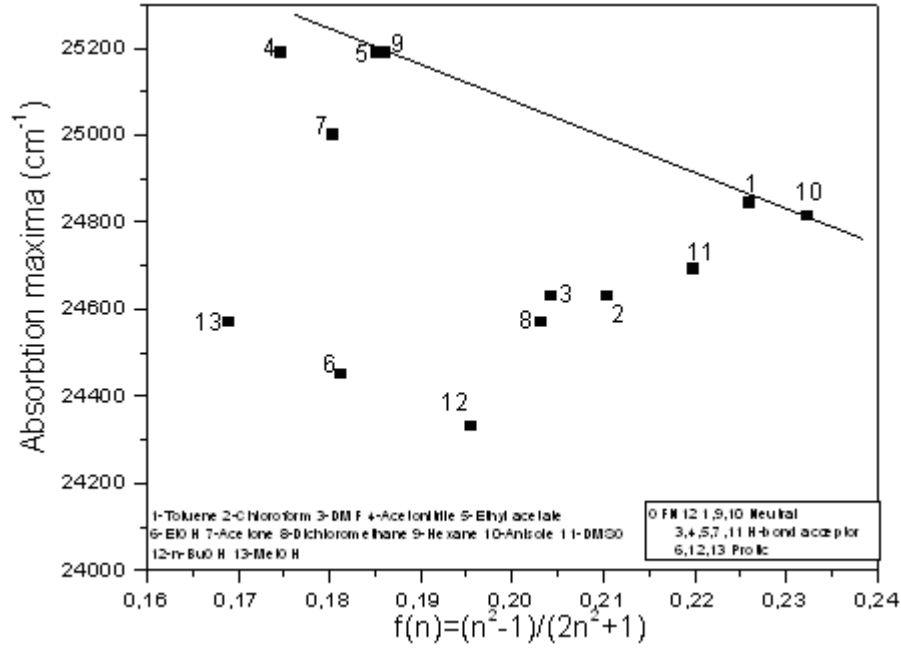


Şekil 4.2.1.3: FN12 probunun farklı polaritelere sahip çözücüler içinde T*

bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumları

Çözücünün genellikle ekzite durumdaki moleküller ile hidrojen bağı oluşturmaması temel hale radyasyonsuz dönüş işlemini arttırdığından floresansın şiddetinde azalma olur. Bu nedenle floresans ölçümleri farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen moleküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumlarında çözücüye bağlı kaymalar görülmüştür. Çözücünün polaritesi floresansın şiddetinden çok dalga boyunu etkiler. Genellikle polaritenin artması ile floresans absorpsiyonunun ve emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kayar. Bu, elektronik uyarılma sırasında dipol momentini artıran kromoforların tipik özelliğidir. Oksijen içeren çözücülerde (dibütil eter, dietiler, THF, etil asetat) bu özellikten sapmalar söz konusudur ve daha düşük dalga boylarına yerleşirler. Bu sapma, proba ait 3-OH ile solvent moleküllerine ait proton akseptör oksijen atomları arasında oluşan moleküller arası hidrojen bağının (ki bu da temel hale fazladan kararlılık kazandırır) sonucu olarak ortaya çıkar.

4.2.2. OFN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri

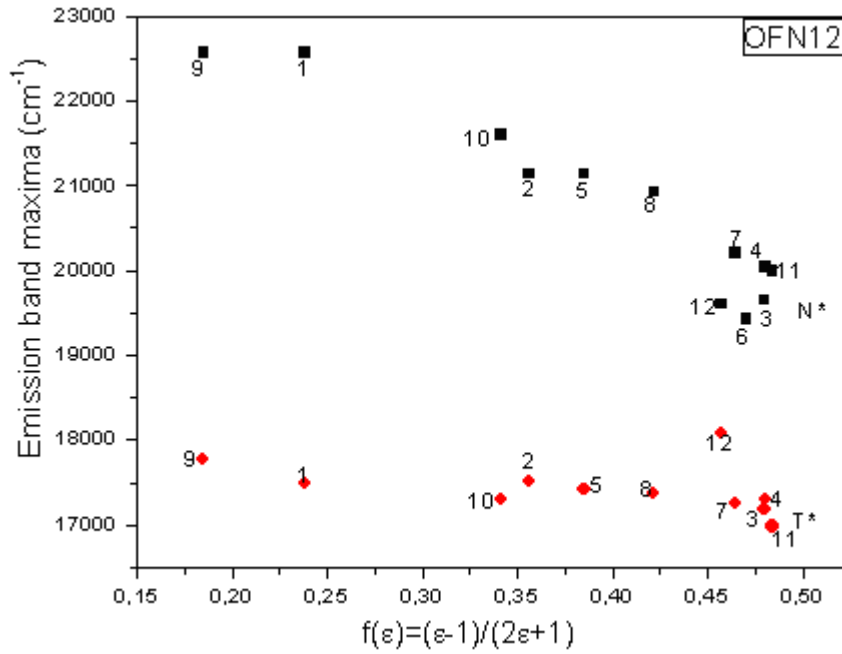


Şekil 4.2.2.1: Çözücünün elektronik polarizlenebilirliğinin birim fonksiyonu olan

$f(n)$ ile prob FN12 nin absorpsiyon maksimumundaki pozisyonunun,

karşılaştırmalı grafiği

Absorpsiyon ölçümleri sırasında farklı çözücü sistemleri kullanıldı. Beklenildiği gibi sentezlenen moleküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumlarında çözücüye bağlı kaymalar görüldü. Tüm çözücülerde, absorpsiyon spektrumunda kırmızıya kayma gözlenmiştir.

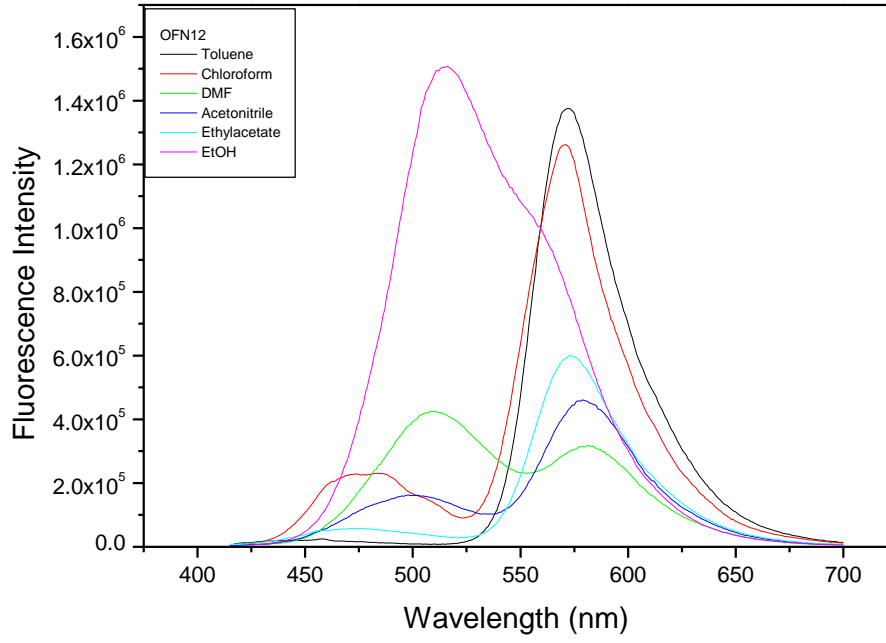


Şekil 4.2.2.2: OFN12 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği

Çözücüler: 1-hekzan, 2-toluen, 3-etilsetat, 4-kloroform, 5-aseton, 6-DMF, 7-asetonitril, 8-BuOH, 9-EtOH, 10-MetOH, 11-hexane

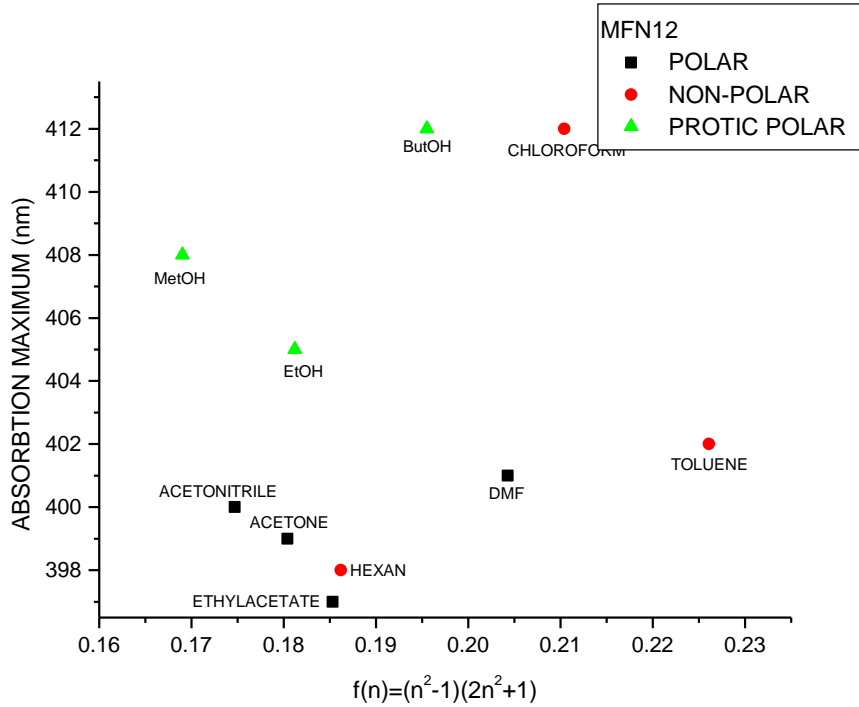
Sentezlenen molekülün emisyon spektrumunda çözücüye bağlı kaymalar görülmüştür. Polaritenin artması ile floresans absorpsiyonunun ve emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kaymıştır.

Farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilen floresans ölçümlerinde çözücünün polaritesi floresansın şiddetinden çok dalga boyunu etkilemiştir. Hidrojen Bağlı olduğu durumlarda da floresans şiddetinde azalma olmuştur.

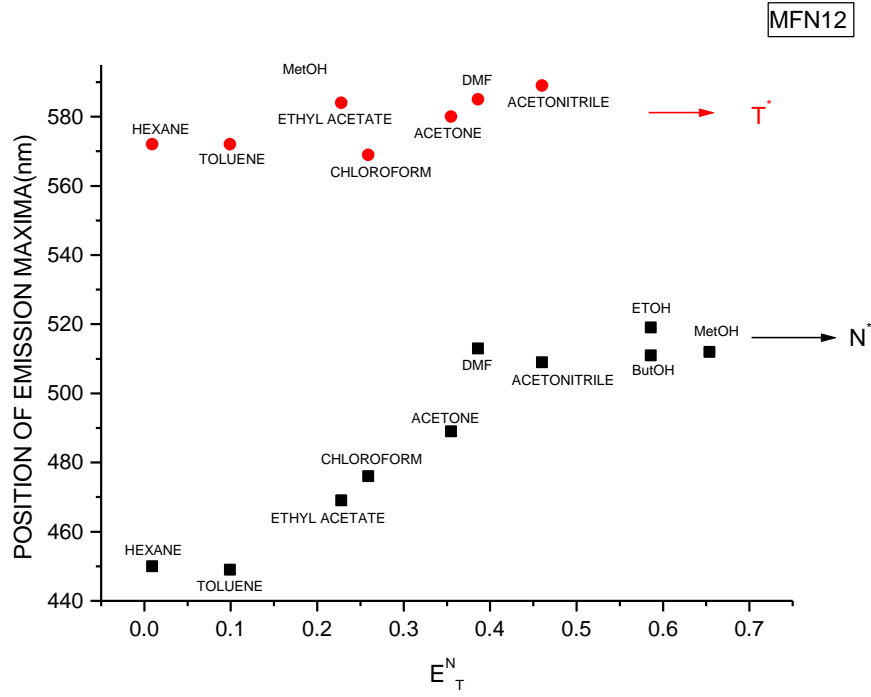


Şekil 4.2.2.3: OFN12 Probonun farklı polaritelere sahip 8 çözücü içindeki karşılaştırmalı flouresans spektrumları

4.2.3. MFN12 Probuna ait Floresans Ölçümleri

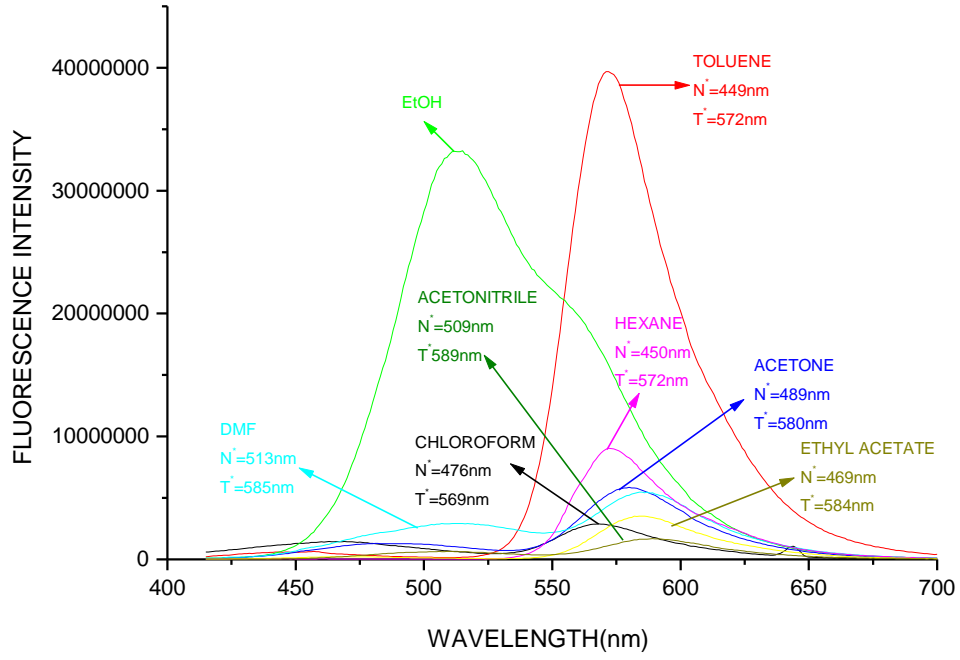


Şekil 4.2.3.1: Çözücünün elektronik polarizlenebilirliğinin birim fonksiyonu olan $f(n)$ ile prob MFN12 nin absorpsiyon maksimumunun karşılaştırılması



Şekil 4.2.3.2: MFN12 probuna ait artan polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumları

Farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilen floresans ölçümlerinde çözücünün polaritesini floresansın şiddetinden çok dalga boyunun etkilediği görülmüştür. Polaritenin artması ile floresans absorpsiyonunun ve emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kaymaktadır.



Şekil 4.2.3.3: MFN12 Probenun farklı polaritelere sahip 8 çözücü içindeki karşılaştırmalı floresans spektrumları

Tablo 4.2: MFN12 probuna ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Number	Solvent	λ_{abs}^{max} (nm)	$\lambda_{max}^{N^*}$ (nm)	$\lambda_{max}^{T^*}$ (nm)	ϵ
1	Toluene	402	449	572	31326
2	Chloroform	412	476	569	35226
3	Acetone	399	489	580	37786
4	DMF	401	513	585	29254
5	Hexane	398	450	572	
6	EtOH	405	512	-	21210
7	MeOH	408	520	-	
8	Acetonitrile	400	509	589	
9	Ethyl acetate	397	469	584	

Λ_{abs}^{max} : absorbsiyon maksimumu

$\Lambda_{max}^{N^*}$: Normal(N*) forma ait floresans emisyon maksimumları

$\Lambda_{max}^{T^*}$: Tautomer(T*) forma ait floresans emisyon maksimumları

Tablo 4.3: FN12 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Number	Solvent	λ_{abs}^{max} (nm)	$\lambda_{max}^{N^*}$ (nm)	$\lambda_{max}^{T^*}$ (nm)	ϵ
1	Toluene	409	457	568	34478
2	Chloroform	418	482	565	33668
3	Acetone	407	502	578	35960
4	DMF	409	511	583	
5	MeOH	416	529	-	35100
6	EtOH	416	525	-	37620
7	BuOH	416	518	-	35870
8	Acetonitrile	407	512	573	45765
9	Ethyl acetate	406	483	572	33247
10	Anisole	413	476	574	35150
11	Dichloromethane	415	494	571	35320
12	Isopropanol	414	513	-	35875
13	DMSO	411	513	585	30745
14	tetrahydrofuran	407	477	576	36190
15	Hexane	407	420	556	28380

Tablo 4.4: OFN12 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Number	Solvent	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{N*}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{T*}}$ (nm)
1	Toluene	402,5	443	572
2	Chloroform	406	473	571
3	Acetone	400	495	580
4	DMF	406	509	582
5	MeOH	409	520	
6	EtOH	409	515	
7	BuOH	411	510	553
8	Acetonitrile	397	499	578
9	Ethyl acetate	397	473	574
10	Anisole	403	463	578
11	Dichloromethane	407	478	576
12	DMSO	405	500	589
13	Hexane	397	443	563

$\Lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$: absorpsiyon maksimumu

$\Lambda_{\text{max}}^{\text{N*}}$: Normal(N*) forma ait floresans emisyon maksimumları

$\Lambda_{\text{max}}^{\text{T*}}$: Tautomer(T*) forma ait floresans emisyon maksimumları

Sonuç olarak; bu çalışmada amaçlanan floresans spektrumunda konjugasyonu arttırılarak kırmızı alana kaymasını sağlanan ve alkil grubunun farklı uzunluklarda olması ile membranda çözünürlüğünü artırılmak istenen FN12 (şekil 4.2.) MFN12 (Şekil 4.3) ve OFN12 (Şekil 4.4) problemleri sentezlenmiştir. Floresans spektrumları problemlerin uygun birer floresans sensör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Non-Polar özelliği artan sensörlerin, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime gireceği ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilebileceği düşünülmektedir.

Grubumuz 3-hidroksiflavonların sentezleri ve özelliklerinin incelenmesi konusunda uzun yılların tecrübesine sahiptir. Grubumuzca sentezlenen bu problemlerin membranlar üzerindeki biyolojik çalışmaları sürdürülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Peter, K. , Vollhardt, C.** *Organic Chemistry*, 2nd. Ed., 1997, pp.785-787.
- [2] **Eğ̈e, S.,** *Organic Chemistry*, 4th ed., Houghton Mifflin, 1999.
- [3] **Solomons, Twg.,** *Organic Chemistry*, 6th ed., John Willey & Sons, 1996.
- [4] **Topçu, G.,** Istanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Doktora Tezi, Istanbul, 1984.
- [5] **Klymchenko, A. S., Öztürk, T., Mely Y., Duportail, G., Pivovarenko, V.G., Demchenko, A. P.,** *Chemistry&Biology*, 1199-1208, (2002).
- [6] **Demchenko, AP.,** *Biochim. Biophys. Acta.* 1209, 149-64, (1994).
- [7] **Klymchenko, AS., Avilov, S.V., ve Demehenko, A. P.,** *Analytical Biochemistry* (2004).
- [8] **K1ymchenko,AS., Demehenko, A.P.,** *Physieal Chemistry Chemical Physies*, 5, 461-8, (2003).
- [9] **Klymchenko A.S., Özturk T., Pivovarenko V.G., Demehenko AP.,** *Tetrahedron Letters*, 42, 7967-7970, (2001).
- [10] **G.W. Ewing,** *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, 5 nd. Ed., Mc Graw-Hill Book Comp., New York (1985).
- [11] **Klymchenko, A.S., Pivovarenko, V.G., Ozturk, T. and Demehenko, A.P.,** *Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxyehromones by substituents, New J. Clzem.,*27 (2003) 1336-1343
- [12] **A. S. Klymchenko, V. G. Pivovarenko, A. P. Demehenko,** *Spectrochim Acta, Part A*, 2003, in press

- [13] **Ying, Q.L., Rinehart, A.R., Simon, S.R., Cheranis, J.C.**, *Biochem. J.*, 277, 521- 526,(1991).
- [14] **Sevil Öksüz**, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Doktora Tezi, İstanbul, (1976).
- [15] **Weber, G., ve Farris, F.J.**, *Biochemistry*, 18,3075-3078, (1979).
- [16] **Bennek, E., Nurten, R., Tiryaki, D., Gökçe, S.**, *Biyofizik Ders Notlari*, Gelistirilmis 2. Baski. ISBN 975-404-502-X, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Yayin No: 188, Üniversite Yayin No:4097, (1997).
- [17] **Klymchenko, AS., Ozturk, T., Pivovarenko, V.G., Me1y,Y. ve Demchenko, AP.** *Chem. Biol.*, 9, 1199-1208, (2002).
- [18] **A. S. Klymehenko, V. G. Pivovarenko, A. P. Demehenko**, *Spectrochim Acta, Part A*, 2003, in press.
- [19] **A. Mordzinski and W. Kühnle.** *J. Phy. Chem*, 1986,90, 1455.
- [20] **Niwayama, S. and Morita, N.** (1988), *Chem. Pharm. Bull* 36,4849.
- [21] **Abdel-Mogib, A., Davvidar, A.M., Metvally. A.M. and Abou-Elzahab, M.** (1990), *Phytochemistry* 29, 2728.
- [22] **Ahmed. A.A., Ali, A.A. and Mabry. T.J.** (1989). *Phytochemistry* 28.665.
- [23] **Gonzalez, A.G., Aguiar, Z.E, Grillo,T.A., Luis, J.G., Rivera, A. and Calle,** (1991). *Phytochemistry*, 30,1269.
- [24] **Adzet, T.. Canigueral, S. and Iglesias. J.** (1988), *Biochem. Syst. Ecol.* 16.
- [25] **Dutta, c.P., Roy, L.P.K.**, *Indian Journal of Chemistry*, 13 (4), 542, (1975).
- [26] **A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko**, *Langmuir*, **2002**,18,5637-5639.
- [27] **P. K. Sengupta, M. Kasha**, *Chem. Phys. Lett*, 1979,68,382-391
- [28] **J. S. Formosinho, G. L. Arnaut**, *J. Photochem. Photobiol A: Chem.* 1993,
- [29] **T. C. Swiney, F. D. Kelley**, *J. Chem. Phys.*, 1993,99, 211-221.
- [30] **A. D. Roshal, A. V. Grigorovich, A. O. Doroshenko, V. G. Pivovarenko, A. P. Demchenko**, *J. Phys. Chem. A*, 1998, 102, 5907-5914.

- [31] **Swinney, T.C., ve Kelley, D.F.**, J. Chem. Phys. 99,211-21, (1993).
- [32] **Zeynep Türkmen**, 2004. Bazı Triterpen Flavon Kombinasyonlarının Hazırlanması ve Biomembranlarda Floresans Prob olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2004)

ÖZGEÇMİŞ

02.05.1980 tarihinde Erzurum’da doğdum. 1998 yılında Hasan Polatkan Süper Lisesini bitirdim ve aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdim. 2003 yılında mezun oldum ve aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimyagerlik Yüksek Lisans Programına başladım.